(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-531143
(P2010-531143A)
(43)公表日　平成22年9月24日(2010.9.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 7/06	(2006.01)	C12N	7/06	ZNA	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B065
A61K 39/12	(2006.01)	A61K	39/12		4C085
A61P 11/00	(2006.01)	A61P	11/00		
A61P 15/06	(2006.01)	A61P	15/06		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 49 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-513497 (P2010-513497)
(86)(22)出願日　平成20年6月24日 (2008.6.24)
(85)翻訳文提出日　平成22年2月17日 (2010.2.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/068041
(87)国際公開番号　WO2009/002981
(87)国際公開日　平成20年12月31日 (2008.12.31)
(31)優先権主張番号　60/946,080
(32)優先日　平成19年6月25日 (2007.6.25)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　509352152
サウス　ダコタ　ステート　ユニバーシティー
アメリカ合衆国　サウスダコタ州　５７００７－１３９６，ブルッキングス，ボックス　２２０１，エイディーエム　１３０
(74)代理人　100096024
弁理士　柏原　三枝子
(74)代理人　100125520
弁理士　高橋　剛一
(74)代理人　100155310
弁理士　柴田　雅仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換え北アメリカ１型ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス及び使用方法

(57)【要約】
ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（ＰＲＲＳＶ）は、養豚産業における世界的に大きな問題である。ワクチンにマーカーを含有させておくと、予防接種を受けた動物と、野生型ウイルスに自然感染した動物とを診断的に区別することが可能になるだろう。北アメリカ１型ＰＲＲＳＶのｃＤＮＡ伝染性クローンを使用して、ｎｓｐ２領域の免疫原性エピトープ、ＥＳ４の欠失を含有する組換え緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）標識ＰＲＲＳＶを作製した。ＧＦＰ及びＥＳ４エピトープに基づくＥＬＩＳＡは、マーカー同定を補完する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
組換え北アメリカ１型ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（ＰＲＲＳＶ）であって、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）１ａに１つ又は複数の突然変異を含み、前記突然変異は、前記組換えＰＲＲＳＶがＯＲＦ１ａに対応する少なくとも１つの機能的ポリペプチドを産生できない突然変異である、組換えＰＲＲＳＶ。
【請求項２】
前記突然変異が欠失を含む、請求項１に記載の組換えＰＲＲＳＶ。
【請求項３】
前記欠失が前記ｎｓｐ２領域にある、請求項２に記載の組換えＰＲＲＳＶ。
【請求項４】
前記欠失がエピトープＥＳ４を含む、請求項３に記載の組換えＰＲＲＳＶ。
【請求項５】
前記欠失がＯＲＦ１ａのアミノ酸７３６～７９０を含む、請求項４に記載の組換えＰＲＲＳＶ。
【請求項６】
前記突然変異が異種性ＤＮＡ配列の挿入を含む、請求項３に記載の組換えＰＲＲＳＶ。
【請求項７】
前記挿入が、ＯＲＦ１ａのアミノ酸７３３と７３４との間にある、請求項６に記載の組換えＰＲＲＳＶ。
【請求項８】
前記挿入が緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）である、請求項６に記載の組換えＰＲＲＳＶ。
【請求項９】
北アメリカＰＲＲＳウイルスをコードする感染性ＲＮＡ分子をコードするＤＮＡ配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子によってコードされる北アメリカＰＲＲＳウイルスであって、前記ＤＮＡ配列が配列番号４３であるＤＮＡ配列を含む、組換え北アメリカＰＲＲＳウイルス。
【請求項１０】
北アメリカ１型ＰＲＲＳＶワクチンであって、ＯＲＦ１ａに突然変異を有する組換えＰＲＲＳＶであり、前記突然変異がＯＲＦ１ａにおける欠失、挿入、又は両方を含む組換えＰＲＲＳＶと、薬学的に許容される担体とを含むワクチン。
【請求項１１】
前記突然変異が前記ｎｓｐ２領域における欠失を含む、請求項１０に記載のワクチン。
【請求項１２】
前記欠失が前記ｎｓｐ２領域のアミノ酸７３６～７９０である、請求項１１に記載のワクチン。
【請求項１３】
前記突然変異が異種性ＤＮＡ配列の挿入を更に含む、請求項１１に記載のワクチン。
【請求項１４】
前記挿入が、前記ｎｓｐ２領域のアミノ酸７３３と７３４との間にある、請求項１３に記載のワクチン。
【請求項１５】
ＯＲＦ１ａに突然変異を有するＰＲＲＳＶ変異体であり、前記突然変異は、前記ＰＲＲＳＶ変異体が機能的ＯＲＦ１ａポリペプチドを産生できない突然変異であり、前記突然変異が異種性ＤＮＡ配列の挿入を含むＰＲＲＳＶ変異体、及び薬学的に許容される担体を含むワクチンと；
前記異種性ＤＮＡ配列によりコードされる１つ又は複数の第１のポリペプチドと；
前記機能的ＯＲＦ１ａによりコードされる１つ又は複数の第２ポリペプチドとを含むキット。

【請求項１６】
前記ＰＲＲＳＶワクチンの前記突然変異が、前記ｎｓｐ２領域における欠失を含む、請求項１５に記載のキット。
【請求項１７】
前記欠失がＥＳ４エピトープであり、前記１つ又は複数の第１のポリペプチドがＧＦＰを含み、前記１つ又は複数の第２のポリペプチドがＥＳ４エピトープを含む、請求項１６に記載のキット。
【請求項１８】
ＰＲＲＳＶマーカーワクチンで予防接種を受けた動物と、ＰＲＲＳＶに自然感染した動物とを区別するための方法であり、前記ＰＲＲＳＶマーカーワクチンが挿入突然変異及び欠失突然変異を含む方法であって：
前記挿入突然変異を含んでいる第１の組換えＰＲＲＳＶタンパク質を準備するステップと；
前記欠失突然変異を含んでいる第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質を準備するステップと；
前記動物由来の血清試料を、前記第１及び第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質と共に定温放置するステップと；
前記試料中の抗体と、前記第１及び第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質との結合を検出するステップとを含み；
前記試料中の抗体と前記第１の組換えＰＲＲＳＶタンパク質との結合が、予防接種を受けた動物を示し、前記試料中の抗体と前記第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質との結合が、自然感染した動物を示す方法。
【請求項１９】
前記第１の組換えＰＲＲＳＶタンパク質がＧＦＰ挿入を含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質がＥＳ４欠失を含む、請求項１８に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２００７年６月２５日に出願された米国仮出願第６０／９４６，０８０号の利益を主張する。
【０００２】
本出願は、分子ウイルス学の分野に関し、より詳しくはブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（ＰＲＲＳＶ）をコードする組換え核酸の構築に関する。
【背景技術】
【０００３】
ブタ生殖器呼吸器症候群（ＰＲＲＳ）は、経済的に最も重要な、ブタの世界的疾患である。この症候群は、雌ブタの後期生殖障害及び新生仔ブタの重症肺炎により特徴付けられる。ＰＲＲＳウイルス（ＰＲＲＳＶ）には、ヨーロッパ遺伝子型（１型）及び北アメリカ遺伝子型（２型）の２つの主要な遺伝子型があり、以前は各々が異なる大陸に見出されていた。より最近では、１型ＰＲＲＳＶ分離株（北アメリカ１型）が、米国の養豚場で同定された。この群のウイルスは、典型的な北アメリカ型及びヨーロッパ型ＰＲＲＳＶとは異なる固有の抗原性特徴及び遺伝子的特徴を有している。固有の５１ｂｐ欠失が、Ｎｓｐ２免疫優勢領域において同定されている。ＰＲＲＳの病原体は、プラス一本鎖ＲＮＡゲノムを含有する小型エンベロープウイルスである。ＰＲＲＳＶは、ウマ動脈炎ウイルス（ＥＡＶ）、乳酸脱水素酵素ウイルス（ＬＤＶ）、及びサル出血熱ウイルス（ＳＨＦＶ）を含む、アルテリウイルス科（Ａｒｔｅｒｉｖｉｒｉｄａｅ）に属する（Ｓｎｉｊｄｅｒ　＆　Ｍｅｕｌｅｎｂｅｒｇ，１９９８）。ヌクレオチド配列を比較すると、ＰＲＲＳＶは、特

徴的なヨーロッパ遺伝子型（１型）及び北アメリカ遺伝子型（２型）に分類できることが判明した（Ａｌｌｅｎｄｅ ｅｔ ａｌ，１９９９；Ｎｅｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ，１９９９）。

【０００４】

ＰＲＲＳＶゲノムは、長さが約１５ｋｂであり、９つのオープンリーディングフレームを含有している。ゲノムの３’末端は、４つの膜結合糖タンパク質（ＧＰ２ａ、ＧＰ３、ＧＰ４、及びＧＰ５；ｓｇ ｍＲＮＡ２～５によりコードされている）、２つの非グリコシル化膜タンパク質（Ｅ及びＭ；ｓｇ ｍＲＮＡ２及び６によりコードされている）、及びヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ；ｓｇ ｍＲＮＡ７によりコードされている）をコードしている（Ｂａｕｔｉｓｔａ ｅｔ ａｌ，１９９６；Ｍａｒｄａｓｓｉ ｅｔ ａｌ，１９９６；Ｍｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９６；Ｍｅｕｌｅｎｂｅｒｇ ＆ ｄｅｎ Ｂｅｓｔｅｎ，１９９６；Ｍｅｕｌｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，１９９５；Ｍｏｕｎｉｒ ｅｔ ａｌ．，１９９５；Ｗｕ ｅｔ ａｌ．，２００１，２００５）。ゲノムの５’末端に位置するレプリカーゼ関連遺伝子、ＯＲＦ１ａ及びＯＲＦ１ｂは、ウイルスゲノムのほぼ７５％に相当する。ＯＲＦ１ａｂにコードされたポリタンパク質ｐｐ１ａｂは、１２か所の部位で切断されて、１３個の産物：ｎｓｐｌα、ｎｓｐｌβ、及びｎｓｐ２からｎｓｐ１２を形成することが予測される（Ａｌｌｅｎｄｅ ｅｔ ａｌ．，１９９９；ｄｅｎ Ｂｏｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９５；Ｎｅｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９；Ｓｎｉｊｄｅｒ ＆ Ｍｅｕｌｅｎｂｅｒｇ，１９９８）。

【０００５】

ＰＲＲＳＶに対する修飾された弱毒化生ワクチンは、ＰＲＲＳＶ関連の臨床疾患を低減するために、現在入手可能である（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｉｎｇｅｌｈｅｉｍ Ａｎｉｍａｌ Ｈｅａｌｔｈ，Ｉｎｃ．社製）。しかしながら、それらは、自然感染から回復したブタと、予防接種を受けたブタとを血清学的に識別することができない。遺伝子的に標識されたワクチンであれば、予防接種を受けたブタと、自然感染したブタとの区別が可能になり、それはＰＲＲＳＶ抑制及び根絶プログラムに必要なことである。

【発明の概要】

【０００６】

組換えブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（ＰＲＲＳＶ）は、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）１ａに１つ又は複数の突然変異を含み、この突然変異は、ＯＲＦ１ａに対応する少なくとも１つの機能的ポリペプチドを組換えＰＲＲＳＶが産生できないような突然変異である。突然変異は欠失であってもよい。欠失は、ｎｓｐ２領域にあってもよく、エピトープＥＳ４を含んでいてもよい。１つの実施形態では、欠失は、ＯＲＦ１ａのアミノ酸７３６～７９０を含む。突然変異は、異種性ＤＮＡ配列の挿入を含んでいてもよい。挿入は、ＯＲＦ１ａのアミノ酸７３３と７３４との間であってもよい。挿入は、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を含んでいてもよい。

【０００７】

組換え北アメリカＰＲＲＳウイルスは、北アメリカＰＲＲＳウイルスをコードする感染性ＲＮＡ分子をコードするＤＮＡ配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子によってコードされ、ＤＮＡ配列は配列番号４３又はそれに相同的な配列である。

【０００８】

ワクチンは、ＯＲＦ１ａに突然変異を有するＰＲＲＳＶ変異体を含み、突然変異は、機能的ＯＲＦ１ａポリペプチドを前記ＰＲＲＳＶ変異体が産生できないような突然変異であり、ワクチンは、薬学的に許容される担体を含んでいる。突然変異は、ｎｓｐ２領域におけるアミノ酸７３６～７９０の欠失などの、ｎｓｐ２領域における欠失を含んでいてもよい。突然変異は、異種性ＤＮＡ配列の挿入を含んでいてもよい。挿入は、ｎｓｐ２のアミノ酸７３３と７３４との間であってもよい。

【０００９】

キットは、ＯＲＦ１ａに突然変異を有するＰＲＲＳＶ変異体であり、この突然変異が、機能的（ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ）ＯＲＦ１ａポリペプチドを前記ＰＲＲＳＶ変異体が産生

できないような突然変異であり、この突然変異が異種性ＤＮＡ配列の挿入を含んでいるＰＲＲＳＶ変異体と、薬学的に許容される担体とを含むワクチンを含む。このキットは、異種性ＤＮＡ配列によりコードされた１つ又は複数の第１のポリペプチド、及び機能的ＯＲＦ１ａによりコードされた１つ又は複数の第２のポリペプチドを更に含む。ＰＲＲＳＶワクチンの突然変異は、ＥＳ４エピトープにおける等のｎｓｐ２領域における欠失であってもよく、１つ又は複数の第１のポリペプチドはＧＦＰを含み、１つ又は複数の第２のポリペプチドはＥＳ４エピトープを含む。

【００１０】

ＰＲＲＳＶマーカーワクチンで予防接種を受けた動物と、ＰＲＲＳＶに自然感染した動物とを区別するための方法であって、ＰＲＲＳＶマーカーワクチンが挿入突然変異及び欠失突然変異を含む方法が提供される。この方法は、挿入突然変異を含んでいる第１の組換えＰＲＲＳＶタンパク質を準備するステップと、欠失突然変異を含んでいる第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質を準備するステップと、動物由来の血清試料を、第１及び第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質と共に定温放置（インキュベート）するステップと、試料中の抗体と、第１及び第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質との結合を検出するステップとを含む。試料中の抗体と第１の組換えＰＲＲＳＶタンパク質との結合は、予防接種を受けた動物を示し、試料中の抗体と第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質との結合は、自然感染動物を示す。第１の組換えＰＲＲＳＶタンパク質は、ＧＦＰ挿入を含んでいてもよく、第２の組換えＰＲＲＳＶタンパク質は、ＥＳ４欠失を含んでいてもよい。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】図１は、ＰＲＲＳＶゲノム及びクローニング戦略の略図である。

【００１２】

【図２】図２Ａ～Ｆは、伝染性クローンｐＳＤ０１－０８の感染性を調査するために実施された免疫蛍光アッセイの結果を表す図である。

【００１３】

【図３】図３は、クローンウイルス、親ウイルス、及びＧＦＰ発現ウイルスの増殖速度論を示すグラフである。

【００１４】

【図４】図４は、クローンウイルス及び親ウイルスＳＤ０１－０８のＲＴ－ＰＣＲ産物の制限酵素断片パターンを表す図である。

【００１５】

【図５Ａ】図５Ａは、クローンウイルスのｉｎ　ｖｉｖｏ特徴付けを示すグラフである。

【図５Ｂ】図５Ｂは、クローンウイルスのｉｎ　ｖｉｖｏ特徴付けを示すグラフである。

【００１６】

【図６】図６Ａ～Ｃは、ＧＦＰ発現ＰＲＲＳＶを調査するために実施された免疫蛍光アッセイの結果を表す図である。

【００１７】

【図７】図７は、ｐＳＤ０１－０８－ＧＦＰ構築体の略図である。

【００１８】

【図８】図８は、ｐＳＤ０１－０８－ＧＦＰ／ΔＥＳ４構築体の略図である。

【００１９】

【図９】図９は、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスの増殖速度論を示すグラフである。

【００２０】

【図１０】図１０は、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルス及び親ウイルスのプラーク形態を表す図である。

【００２１】

【図１１】図１１は、ＧＦＰ発現の安定性を表す図である。

【００２２】

【図１２】図１２は、野生型ＧＦＰ遺伝子と、Ａｒｇ９７変異ＧＦＰ遺伝子との比較を表

す図である。
【００２３】
【図１３】図１３は、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスのｉｎ　ｖｉｖｏ特徴を表すグラフである。
【００２４】
【図１４Ａ】図１４Ａは、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスのウイルス学的及び免疫学的特性を表すグラフである。
【図１４Ｂ】図１４Ｂは、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスのウイルス学的及び免疫学的特性を表すグラフである。
【図１４Ｃ】図１４Ｃは、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスのウイルス学的及び免疫学的特性を表すグラフである。
【００２５】
【図１５Ａ】図１５Ａは、ＧＦＰ及びＥＳ４エピトープに基づくＥＬＩＳＡの結果を表す図である。
【図１５Ｂ】図１５Ｂは、ＧＦＰ及びＥＳ４エピトープに基づくＥＬＩＳＡの結果を表す図である。
【図１５Ｃ】図１５Ｃは、ＧＦＰ及びＥＳ４エピトープに基づくＥＬＩＳＡの結果を表す図である。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
北アメリカ１型ＰＲＲＳＶ分離株の全長ｃＤＮＡクローン、ＳＤ０１－０８を開発した。レリスタッドウイルス（Ｌｅｌｙｓｔａｄ　ｖｉｒｕｓ）と比較すると、ＳＤ０１－０８は、ヌクレオチドレベルで９４．１％の同一性を共有する（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＤＱ４８９３１１）。ＳＤ０１－０８とＬＶとの重要な相違は、ＰＡＭ及びサル腎細胞中での増殖特性である。Ｍｅｕｌｅｎｂｅｒｇら（１５）により報告された結果は、野生型ＬＶウイルス及びクローンＬＶウイルスはＰＡＭ中でよく増殖するが、ＭＡ－１０４派生細胞系（ＣＬ２６２１）では低レベルにしか増殖しなかったことを示した。親ＳＤ０１－０８及びクローンＳＤ０１－０８は、ＰＡＭ、及び別のＭＡ－１０４派生細胞系であるＭＡＲＣ－１４５細胞で、同様によく増殖した。ＳＤ０１－０８クローンウイルスの力価は、４８ｈｐｉでピークに達し、一方、ＬＶクローンウイルスは、より低力価に増殖し、９６ｈｐｉにおいてでさえピークに達しなかった。従って、ＳＤ０１－０８伝染性クローンは、連続継代細胞系でよく複製する。ＬＶとＳＤ０１－０８との間の別の相異は、毒性のレベルである。ＰＡＭでは、ＬＶクローンウイルスは、$10^{7.1}$から$10^{7.9}$ＴＣＩＤ$_{50}$／ｍｌの高力価に達し、約３２ｈｐｉでピークに達した。ＳＤ０１－０８クローンウイルスは、ＰＡＭ中でその親ウイルスと同じ力価に達したが、それらの力価は両方ともＬＶの力価より低く、わずかに約10^{4}ＴＣＩＤ$_{50}$／ｍｌに達しただけであり、より後期の約７２ｈｐｉでピークに達した。この結果は、ＳＤ０１－０８クローンウイルスが、ＬＶクローンウイルスより毒性が低いことを示唆する。この結論は、野外観察及び実験動物負荷研究により支持されている。ＳＤ０１－０８は、実験的に感染させたブタでは、著しい臨床的徴候を引き起こさず、軽度の病理学的病変が観察されただけだった。対照的に、ＬＶは、ブタに著しい呼吸器障害を引き起こし、雌ブタに流産を引き起こすことが報告された（３４）。
【００２７】
伝染性クローンの主な応用の１つは、遺伝子操作されたワクチンを構築するためのウイルス骨格として、それを使用することである。米国において現在使われているＰＲＲＳＶワクチンは、主として北アメリカ２型分離株を標的とする。北アメリカ１型ＰＲＲＳＶの出現により、両遺伝子型のＰＲＲＳＶに有効なワクチンが必要とされている。あらゆる生ウイルスワクチンの必須条件は、その毒性が低く、疾患症状を全く誘発しないか、又は酷くともごく軽い疾患症状しか誘発しないということである。親ウイルス、ＳＤ０１－０８は、臨床的徴候を示さないブタの群から単離された。病原論的研究により、ＳＤ０１－０

８は、疾患の急性期において低毒性の特性を有することが確認されており、ｐＳＤ０１－０８伝染性クローンが、有望な低毒性株であり、ワクチン構築に好適であることを示唆した。

【００２８】

ワクチン開発の重要なステップの１つは、予防接種を受けた動物と、野生型ウイルスに自然感染した動物とを診断的に区別するためのマーカーを含有させることである。マーカーワクチンは、食用動物並びにコンパニオンアニマルにおけるウイルス感染の抑制又は根絶を目指したプログラムにおいて重要である（Ｂａｂｉｕｋ，１９９９；Ｂａｂｉｕｋ ｅｔ ａｌ，１９９９，２００；ｖａｎ Ｏｉｒｓｃｈｏｔ，２００１）。ヘルペスウイルスマーカーワクチンは、中でも最初に現場で有効であることが証明され（Ｂｏｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９６；ｖａｎ Ｏｉｒｓｃｈｏｔ ｅｔ ａｌ．，１９９６）、その後、古典的なブタコレラウイルス（Ｗｉｄｊｏｊｏａｔｍｏｄｊｏ ｅｔ ａｌ．，２０００；ｖａｎ Ｇｅｎｎｉｐ ｅｔ ａｌ．，２００２）及び牛疫ウイルス（Ｗａｌｓｈ ｅｔ ａｌ．，２０００）等の、種々の遺伝子修飾ＲＮＡウイルスが続いた。ＥＡＶ根絶プログラムでは、ウマが活発に国際貿易及び交通に関与しているため、マーカーワクチンは、幾つかの法律当局によってに必要とされている。予防接種と感染との識別は、支配的な問題になりつつある（Ｃａｓｔｉｌｌｏ－Ｏｌｉｖａｒｅｓ ｅｔ ａｌ．，２００３）。同様に、ＰＲＲＳＶ根絶プログラムでは、ブタ及び豚肉の国際貿易は、将来的にマーカーワクチンを必要とする可能性が高くなるだろう。更に、世界がＰＲＲＳＶの根絶に向かって進んでいく際に、血清調査は、疾患状態を確認するのに不可欠なツールである。現在入手可能な従来型ワクチンでは、野生型感染と予防接種との区別を可能にすることができない。従って、予防接種が進行中である間、又は予防接種の中止後の数か月間は、血清調査が不可能である。明らかに、マーカーワクチンは大きな有益性をもたらすであろう。

【００２９】

北アメリカ１型ＰＲＲＳＶの伝染性クローン、ｐＳＤ０１－０８を使用して、組換えＰＲＲＳＶを生成した。ヨーロッパ型レリスタッドウイルス（ＬＶ）伝染性クローンと比較して、ｐＳＤ０１－０８は、（１）ｐＳＤ０１－０８伝染性クローンは、北アメリカ１型ＰＲＲＳＶである、２００１年に米国で単離された親株に由来する；（２）親株ＳＤ０１－０８は、臨床的徴候を示さない８週齢のブタの群から単離された；および（３）ＳＤ０１－０８は、Ｎｓｐ２の免疫優勢領域において固有の５１ｂｐ欠失を有するという幾つかの特徴的な生物学的特性を有する（Ｆａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００４）。

【００３０】

ｎｓｐ２はウイルス複製に役割を果たす。ｎｓｐ２は、Ｎ末端にあるシステインプロテアーゼドメインを含有している。このドメインは、ｎｓｐ２／３切断を誘導し、ｎｓｐ４セリンプロテアーゼのコファクターとしても機能して、他の切断産物をプロセシングする（Ｓｎｉｊｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９４，１９９５；Ｗａｓｓｅｎａａｒ ｅｔ ａｌ．，１９９７）。ＥＡＶ及びＰＲＲＳＶ ｎｓｐ２のシステインプロテアーゼは、ウイルス複製におけるその機能に加えて、卵巣腫瘍（ＯＴＵ）プロテアーゼスーパーファミリーに属することが示されている。ＯＴＵプロテアーゼは、ユビキチン及び細胞タンパク質に由来するＩＳＧ１５の両方を脱コンジュゲートすることが可能であり、Ｕｂ依存性及びＩＳＧ１５依存性の先天性免疫応答を阻害する（Ｆｒｉａｓ－Ｓｔａｈｅｌｉ ｅｔ ａｌ．，２００７）。

【００３１】

マーカーワクチンの開発は、外来性抗原をそこに挿入することができるか（陽性マーカー）、又は免疫原性エピトープをそこから欠失させることができる（陰性マーカー）ｃＤＮＡ伝染性クローンの操作に基づく。外来性抗原又はウイルスエピトープに対する抗体応答を使用すると、予防接種を受けた動物と自然感染した動物とを区別することができる。ＰＲＲＳＶ ｎｓｐ２は、マーカー修飾の優れた候補部位である。マーカー操作に関するｎｓｐ２の最も重要な特性は、ｎｓｐ２が大きな欠失及び挿入を許容できるということで

ある。このタンパク質の中央領域内におけるヌクレオチド配列の挿入／欠失は報告されている（Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，２００４；Ｓｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０００；Ｔｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００７；Ｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。マーカー操作に関する別の特性は、この領域に幾つかの免疫優勢エピトープが存在することである。デンマーク１型ウイルスのｎｓｐ２領域において、６つの直鎖Ｂ細胞エピトープ部位（ＥＳ）（ＥＳ２からＥＳ７）が同定されている（Ｏｌｅｋｓｉｅｗｉｃｚ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。２型ウイルスでは、構造タンパク質と比較して、ｎｓｐ２は、免疫優勢エピトープを最も高い頻度で含有することが見出されている（ｄｅ　Ｌｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。

【００３２】

米国１型ＰＲＲＳＶ伝染性クローンのｎｓｐ２領域におけるマーカー修飾を調製した。陽性マーカー、ＧＦＰをｎｓｐ２領域に挿入したが、ＧＦＰ遺伝子は安定しなかった。次に、ｎｓｐ２領域に位置している高度に免疫原性のエピトープ、ＥＳ４（ＯＲＦ１ａのアミノ酸７３６から７９０）を欠失させ、逆遺伝学を使用してＧＦＰ遺伝子と置換し（ＯＲＦ１ａのアミノ酸７３３／７３４で）、陰性マーカーを生成した。その結果生じた組替えウイルスのｉｎ　ｖｉｔｒｏ複製特徴、及びｉｎ　ｖｉｖｏ生物学的特性を特徴付けて、ＰＲＲＳＶ感染に対するマーカーワクチンとしてのその潜在的有用性を決定した。ＧＦＰ抗原及びＥＳ４ペプチド抗原に基づくＥＬＩＳＡを試験して、マーカー検出及び区別用の携帯診断アッセイとしての、それらの感受性及び特異性を決定した。

【００３３】

Ｉ．陽性マーカーＧＦＰ

細胞及びウイルス。北アメリカ１型ＰＲＲＳＶ分離株、ＳＤ０１－０８は、米国において８週齢のブタの群から２００１年に初めて単離されたものであり、ＰＲＲＳの臨床的徴候を示していなかった。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写されたＲＮＡからウイルスを復元するために、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ－２１Ｃ１３：アメリカ培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）を初期形質移入に使用した。ＭＡＲＣ－１４５細胞を、ウイルス救出及びその後の実験に使用した（Ｆａｎｇ　ｅｔ　ａｌ，２００６）。特異的病原体未感染のＰＲＲＳＶ未感染子ブタの肺洗浄によって、ブタ肺胞マクロファージ（ＰＡＭ）細胞を取得した。

【００３４】

ＲＮＡ抽出、ＲＴ－ＰＣＲ、及び配列決定：ＭＡＲＣ－１４５細胞を、およそ０．１ＭＯＩでプラーク精製ウイルスに感染させた。３日後に、培養液上清を０．５Ｍスクロースクッション上に重ねて、１００，０００×ｇで１４時間、ＳＷ４１ローター（Ｂｅｃｋｍａｎ社製）で遠心分離した。ＱＩＡａｍｐウイルスＲＮＡキット（Ｑｉａｇｅｎ社製）を使用して、ペレットからＲＮＡを抽出した。親ウイルス、ＳＤ０１－０８の全長ゲノム配列を取得するために、一連のプライマーを使用してＲＴ－ＰＣＲを実施した（Ｒｏｐｐ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。各ＲＴ－ＰＣＲ産物を、両方向から少なくとも２回直接的に配列決定して、コンセンサス配列を取得した。伝染性クローンを構築するために、固有の制限酵素部位により隣接された全長ウイルスゲノムをカバーする９つのオーバーラップ断片（図１）を、ＲＴ－ＰＣＲにより増幅した。ＲＴ－ＰＣＲ増幅用の順方向及び逆方向オリゴヌクレオチドを、最初はＬＶ配列（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｍ９６２６２；１８）に基づいて設計し、その後修飾してＳＤ０１－０８配列と一致させた（表１）。ＲＴ－ＰＣＲを実施した（Ｆａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。これらのＲＴ－ＰＣＲ増幅断片をゲル精製し、ＰＣＲ－ＢｌｕｎｔＩＩ－Ｔｏｐｏベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）にクローニングした。各断片の３つのクローンを配列決定し、コンセンサス配列を含有するクローンを使用して伝染性クローン組み立てた。

【００３５】

表１．ＲＴ－ＰＣＲ増幅用に使用されたプライマー

【表１】

プライマー	配列	ゲノム位置
		in SD01-08
断片		
E4849F	5’ gca tgg ctc tta agg cag ac 配列番号 1	4849 - 4868
E7227R	5’ cag ctt caa ggc agt tgt ca 配列番号 2	7208 - 7227
断片 b		
E7139F	5’ tgt tgt gat cgg cgg tat ta 配列番号 3	7139 - 7158
E8297R	5’ cgg cgc ggg cac aca ttt cgt caa ttt 配列番号 4	8271 - 8297
断片 c		
E8090F	5’ tac gac cta tcc acc caa gg 配列番号 5	8090 - 8109
E10275R	5’ gaa tct atg gtt atc gca gag c 配列番号 6	10254 - 10275
断片 d		
E9946F	5’ cct cga tga ggc tgg ata tt 配列番号 7	9946 - 9965
E12929R	5’ gca cca acc agg agg aaa aaa gc 配列番号 8	12907 - 12929
断片 e		
E3173F	5’ cat tct tgc gtc cct caa at 配列番号 9	3173 - 3192
E5352R	5’ cga cag tct ttc tgc cat caa tg 配列番号 10	5330 - 5352
断片 f		
E2229F	5’ gct gct gtt gtc ctg tgt t 配列番号 11	2229 - 2247
E3397R	5’ ccg tcg aag ggg gtg gca tcc 配列番号 12	3377 - 3397
断片 g		
E12482F	5’ tca ttc gag ctg acc atc aa 配列番号 13	12482 - 12501
E14651R	5’ ctt tat cat tgc acc cag caa 配列番号 14	14631 - 14651
断片 h		
E1GF	5’ ggc gcg cct aat acg act cac tat aga tga tgt gta ggg tat 配列番号 15	1 - 16
E2968R	5’ cgc ggg cgc ctg agt tcg aca aat t 配列番号 16	2944 - 2968
断片 i		
E14059F	5’ caa cga tcc tac cgc cgc aca a 配列番号 17	14059 - 14080
018 Poly AR	5’ ggc gat cgg gcg tct agg aat tct aga $(T)_{41}$ aat ttc ggt cac 配列番号 18	15036 - 15047

表1は次頁につづく

018 3' R	5' ggc gat cgg gcg tct agg aat tc 配列番号 19	polyAの後
ORF7における固有な制限酵素部位の構築		
E14059F	5' caa cga tcc tac cgc cgc aca a 配列番号 20	14059 -14080
YFp503R	5' ggc ccc agt gct gca atg ata c 配列番号 21	polyAの後
ScaIF *	5' aga aga aaa aga aaa gta c***t***g ctc caa tgg g 配列番号 22	14569-14599
ScaIR *	5' ccc cat tgg agc ***a***gt act ttt ctt ttt ctt 配列番号 23	14571-14600
Nsp2領域におけるGFP挿入		
gfpF	5' gct cag atg gtg agc aag ggc gag gag c 配列番号 24	
gfpR	5' gag tct gaa gag gac ttg tac agc tcg tcc a 配列番号 25	
Nsp2F1	5' tgc tga ctt tct tgc tga tcc acc tcc t 配列番号 26	1895-1922
Nsp2R1	5' cct tgc tca cca tct gag cac tcc cg 配列番号 27	2408-2420
Nsp2F2	5' gct gta caa gtc ctc ttc aga ctc caa ga 配列番号 28	2419-2439
Nsp2R2	5' gcg gac cca gcc agg atc aga c 配列番号 29	2732-2753

＊Ｓｃａ１制限酵素部位を生成ために突然変異されたヌクレオチドは、太字及びイタリック体である。

【００３６】

製造業者の説明書に従ってＧｅｎｅＲＡＣＥＲキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を使用し、ゲノム配列の５’及び３’末端を決定した。ウイルスゲノムの５’末端を表す断片は、真正５’末端ヌクレオチド及びＡｓｃ１制限酵素部位の直前にＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ部位を組み込んだプライマー、Ｅ１ＧＦ及びＥ２９６８Ｒ（表１）を用いたＲＴ－ＰＣＲを使用して調製した。３’末端配列を含有する断片を、４１個のポリＡ残基及びＸｂａｌ部位を隣接しているプライマー０１８ポリＡを用いたＲＮＡの逆転写により構築した。逆転写反応後に、プライマーＥ１４０５９Ｆ及び０１８　３’Ｒ（表１）を用いてＰＣＲを行った。

【００３７】

北アメリカ１型ＰＲＲＳＶの全長ｃＤＮＡクローンの構築及びその感染性の決定

北アメリカ１型ＰＲＲＳＶの全長ゲノムｃＤＮＡクローン、ｐＳＤ０１－０８を、図１に示される戦略を使用して構築した。ＢａｍＨ１及びＢｇｌ１部位間の断片を、図１に示されるような制限酵素部位を含有する合成遺伝子として調整したスタッファー断片に置換することにより、低コピー数プラスミドｐＡＣＹＣ１７７（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｘ０６４０２）を修飾した。ＰＣＲ－ＢｌｕｎｔＩＩ－Ｔｏｐｏから制限酵素を使用して、ウイルス断片の各々を切り出し、同じ制限酵素で消化したｐＡＣＹＣ１７７プラスミドにライゲーションした。各ライゲーションステップ後で、ｐＡＣＹＣ１７７構築体を大腸菌ＤＨ５α細胞に形質転換し、カナマイシンの存在下で終夜３７℃で増殖させた。完全に組み立てられた全長ｃＤＮＡクローンを配列決定し、全長ゲノム配列を受入番号ＤＱ４８９３１１でＧｅｎＢａｎｋに寄託した。

【００３８】

Ｓｃａ１制限酵素部位を生成するために、ＯＲＦ７のヌクレオチド４２（ＳＤ０１－０８ゲノムのヌクレオチド１４５８８）でのサイレント突然変異（ＧからＴへの突然変異）を、指定部位突然変異誘発を使用して生成した。指定部位突然変異誘発は、プライマー対Ｅ１４０５９Ｆ／Ｓｃａ１Ｒ及びＳｃａ１Ｆ／ＹＦｐ５０３Ｒを使用して、オーバーラップ伸長ＰＣＲ技術（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９；Ｊｅｓｐｅｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）により達成した。ＤＮＡ配列決定分析により、突然変異産物を確認した。

【００３９】

この構築体は、ウイルスゲノムの５’末端にあるバクテリオファージＴ７ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、Ｔ７プロモーターとウイルスゲノムの最初のヌクレオチドとの間に導入された１個の追加的グアノシン残基、ＳＤ０１－０８の１５０４７ヌクレオチド全長ゲノム、及びゲノムの３’末端に組み込まれた４１残基のポリ（Ａ）尾部を含有している。親ウイルスのゲノム配列と比較して、ｐＳＤ０１－０８のＤＮＡ配列は、６つのヌクレオチドの違いを含有していた（表２）。

【００４０】

表２．親ＳＤ０１－０８分離株と全長ｃＤＮＡクローンとのヌクレオチドの違い

【表２】

SD01-08 内のヌクレオチド位置	親ウイルスのヌクレオチド	cDNA クローンのヌクレオチド	アミノ酸変化	遺伝子位置
1331	T	C	サイレント	Nsp1β
6158	T	C	サイレント	Nsp5
8191	A	G	サイレント	Nsp9
9492	C	T	PからL	Nsp10
11261	T	C	YからH	Nsp11
14588	G	T	サイレント	ORF7

【００４１】

これらの違いのうち４つは、サイレント突然変異であった。クローンウイルスと親ウイルスとを区別するために、ヌクレオチド１４５８８の突然変異をＯＲＦ７に導入して、固有のＳｅａ１制限酵素部位を生成した。ヌクレオチド突然変異のうちの２つはアミノ酸変化に帰着し、それらには、Ｎｓｐ１０に位置するヌクレオチド９４９２におけるＣからＴへの置換（アミノ酸ＰからＬ）、及びＮｓｐ１１に位置するヌクレオチド１１２６１におけるＴからＣへの置換（アミノ酸ＹからＨ）が含まれていた。

【００４２】

プラスミドｐＳＤ０１－０８を制限酵素Ｘｂａｌで線形化し、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼによるｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写に使用して、キャッピングされたＲＮＡを合成した。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写のキャッピングされたＲＮＡを、ＢＨＫ－２１細胞に形質移入した。形質移入４８時間後に、ｍＡｂ　ＳＤＯＷ１７を用いた蛍光抗体染色により、細胞を、Ｎタンパク質の発現について検査した（図２Ａ）。図２Ａの結果は、形質移入された細胞の約５％がＮタンパク質を発現したことを示した。形質移入された細胞由来の上清を、ＭＡＲＣ－１４５細胞で継代した。７２時間後、ＭＡＲＣ－１４５細胞を、ＳＤ０１－０８特異的抗Ｎｓｐ２ｍＡｂ、ＥＳ３－４　５８－４６（図２Ｂ）及び抗Ｎ　ｍＡｂ　ＳＤＯＷ１７（図２Ｃ）を使用して染色した。北アメリカ２型ＰＲＲＳＶ特異的抗Ｎ　ｍＡｂ　ＭＲ３９（図２Ｄ）を、陰性対照として組み入れた。その結果は、Ｎｓｐ２及びＮタンパク質の両方が、ｐＳＤ０１－０８で形質移入されたＢＨＫ－２１細胞に由来する上清で接種されたＭＡＲＣ－１４５細胞において検出されたことを示した。上清を新しいＭＡＲＣ－１４５細胞で更に継代すると（ＭＡＲＣ－１４５細胞での継代２）、細胞変性効果（ＣＰＥ）が、４８から７２感染後時間（ｈｐｉ）以内に観察された。ＭＡＲＣ－１４５細胞での継代２に由来するウイルス滴定は、３．６×１０^{7}ＦＦＵ／ｍｌの平均力価を示した。これらの結果は、生存可能な伝染性北アメリカ１型ＰＲＲＳＶが、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写のＲＮＡで形質移入した細胞から救出されたことを示す。

【００４３】

ＧＦＰ挿入：プラスミドｐＳＤ０１－０８中のウイルスゲノムのＮｓｐ２領域（ヌクレオチド２４２０／２４２１）に、ＧＦＰ遺伝子配列（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）を挿入する

ことにより、ｐＳＤ０１－０８－ＧＦＰクローンを構築した。ＧＦＰ遺伝子を、順方向プライマーｇｆｐＦ及び逆方向プライマーｇｆｐＲを用いて、ｐＥＧＦＰ－Ｎ１プラスミド（ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）から増幅した。Ｎｓｐ２Ｆ１／Ｎｓｐ２Ｒ１及びＮｓｐ２Ｆ２／Ｎｓｐ２Ｒ２のプライマー対を使用して、オーバーラップ伸長ＰＣＲ技術（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ；　１９８９、Ｊｅｓｐｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９７）により、ＧＦＰを挿入した。ＰＣＲ産物をＲｓｒｌ１及びＡｃｌ１制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化したｐＳＤ０１－０８プラスミドにライゲーションした。

【００４４】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写及びＰＲＲＳＶの救出：プラスミド、ｐＳＤ０１－０８又はｐＳＤ０１－０８－ＧＦＰを、制限酵素Ｘｂａ１で線形化した。ｍＭｅｓｓａｇｅ　Ｍａｃｈｉｎｅキット（Ａｍｂｉｏｎ社製）を使用して、キャッピングされたＲＮＡをＴ７　ＲＮＡポリメラーゼで転写し、製造業者の説明書に従ってＤＭＲＩＥ－Ｃ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を使用し、ＢＨＫ－２１細胞に形質移入した。ウイルスを救出するために、形質移入４８時間後に得られた細胞培養上清を、ＭＡＲＣ－１４５細胞で連続継代した。伝染性ウイルスの救出は、間接免疫蛍光測定法（ＩＦＡ）（Ｒｏｐｐ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）によって確認した。ＳＤ０１－０８のＮｓｐ２を特異的に認識するＭＡｂ　ＥＳ３－４　５８－４６を含むモノクローナル抗体（ＭＡｂ）を、ＩＦＡ検査で使用するために開発した（Ｆａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｏｎｆ．Ｒｅｓ．Ｗｏｒｋ．Ａｎｉｍ，Ｄｉｓ．，ａｂｓｔｒ．７８，２００４）。ＭＡｂ　ＭＲ３９は、北アメリカ２型ＰＲＲＳＶのＮタンパク質を特異的に認識し、ＭＡｂ　ＳＤＯＷ１７は、両遺伝子型のＰＲＲＳＶのＮタンパク質を認識する（Ｎｅｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３；Ｒｏｐｐ　ｅｔ　ａｌ，２００４）。ＧＦＰウイルスの救出については、更にＧＦＰの発現を蛍光顕微鏡で直接的に視覚化した。

【００４５】

ＭＡＲＣ－１４５細胞を０．１ＭＯＩのクローンウイルス及び親ウイルスに感染させることにより、増殖速度論を検討した。０、６、１２、２４、３６、４８、６０、及び７２感染後時間に感染細胞を収集し、ウイルス力価をＭＡＲＣ－１４５細胞でのＩＦＡにより決定し、１ｍｌ当たりの蛍光焦点単位（ＦＦＵ／ｍｌ）として定量化した。クローンウイルス及び親ウイルス間のプラーク形態を、ＭＡＲＣ－１４５細胞でのプラークアッセイにより比較した。コンフルエント細胞単層を、０．１ＭＯＩのウイルスに感染させた。２時間後、細胞培養上清を取り除き、寒天重層をアプライした。３７℃で５日後にプラークを検出し、０．１％クリスタルバイオレットを使用して染色した。

【００４６】

クローンウイルスのｉｎ　ｖｉｔｒｏ特徴付け

親ウイルス及びクローンウイルス（ＭＡＲＣ－１４５細胞上での継代２）を、ブタ肺胞マクロファージ（ＰＡＭ）に滴定した。抗Ｎ　ｍＡｂを使用した免疫蛍光染色は、両ウイルスがＰＡＭで複製したことを示し（図２Ｅ及び２Ｆ）、７２ｈｐｉで同様のウイルス収量（２．１～２．８×10^4ＦＦＵ／ｍｌ）をもたらした。

【００４７】

クローンウイルス及び親ウイルスの増殖特性を更に比較するために、ＭＡＲＣ－１４５細胞を０．１ＭＯＩの各ウイルスに感染させ、６、１２、２４、３６、４８、６０、及び７２ｈｐｉで回収した。その結果、増殖曲線は、クローンウイルスが、親ウイルスの増殖速度論と同様の増殖速度論を有していたことを示した（図３）。力価は、両ウイルスとも４８ｈｐｉでピークに達した。クローンウイルスのピーク力価は、親ウイルスの２．３４×10^7ＦＦＵ／ｍｌに対して、１．３９×10^7ＦＦＵ／ｍｌであった。これらのウイルスのプラーク形態も決定し、クローンウイルスによりもたらされたプラークサイズは、親ウイルスのプラークサイズに類似していた（データ非表示）。これらの結果は、クローンウイルスが、親野生型ウイルスと同様のｉｎ　ｖｉｔｒｏ特性を有することを示す。

【００４８】

クローンウイルスと親ウイルスとを区別するために、本発明者らは、ＯＲＦ７のヌクレ

オチド４２にＳｅａ１制限酵素部位を設計した。図４に示されているように、ヌクレオチド１３８７５から１４９２８の増幅に由来する１０５４ｂｐのＲＴ－ＰＣＲ断片は、クローンウイルスのＳｅａ１によって切断された。対照的に、親ウイルスに由来するＲＴ－ＰＣＲ断片は、Ｓｅａ１によって切断されなかった。

【００４９】

ブタモデルのｐＳＤ０１－０８に由来するクローンウイルスの病原性特性及び免疫学的特性

育仔場ブタモデルを使用して、伝染性クローンに由来するウイルスの複製特性に関するｉｎ　ｖｉｖｏ研究を実施した。２１頭の４週齢ＰＲＲＳＶ未感染ブタを認定ＰＲＲＳＶ陰性群から取得し、４群に無作為分割し、別々に隔離施設に収容した。４日間の順応期間後、各群のブタを（クローンウイルス感染群の場合は、ｎ＝６；残りの群の場合は、ｎ＝５）、10^5ＴＣＩＤ$_{50}$のクローンウイルス（群１）又は親ウイルス（群２）を１ｍｌ用いて鼻腔内接種した。動物の第３群を、現行の修飾生ウイルス（ＭＬＶ）Ｉｎｇｅｌｖａｃ（登録商標）ＰＲＲＳＶワクチンで接種した。陰性対照群（群４）の動物を、ＭＡＲＣ－１４５細胞培養上清で偽負荷した。

【００５０】

感染後の最初の７日間は、毎日、ブタの臨床的徴候を観察し、体温を測定した。０、７、１４、２１、２８、３５、及び４２日目に、全てのブタから血液試料を取得した。血清試料を、更なる検査のために－８０℃で保管した。急性感染の死後分析のために、各群から２頭のブタを接種後２１日目（ｄｐｉ）に安楽死させた。各群の残りの３頭のブタを、４２ｄｐｉに安楽死させた。研究動物の肺病変を、各葉が全肺に寄与する近似容積に基づく以前に開発した方式を使用して評価した：左及び右頂葉、左及び右心臓葉、及び各中葉は、各々全肺容積の１０％に寄与し、左及び右尾部側葉は各々２５％に寄与する。その後、これらのスコアを使用して、各葉の相対的寄与に基づく合計肺病変スコアを算出した（Ｈａｌｂｕｒ　ｅｔ　ａｌ，１９９５）。

【００５１】

ウィルスＲＮＡの検出及びウイルス負荷の決定ついては、０、７、１４、２１、２８、３５、及び４２ｄｐｉでの血清試料を、Ｓｏｕｔｈ　Ｄａｋｏｔａ　Ａｎｉｍａｌ　Ｄｉｓｅａｓｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（ＳＤＳＵ－ＡＤＲＤＬ）で日常的に実施されているリアルタイム定量ＰＣＲ（Ｔｅｔｒａｃｏｒｅ　ＶｅｔＡｌｅｒｔ　ＰＲＲＳ；Ｗａｓｉｌｋ　ｅｔ　ａｌ，２００４）を使用して検査した。血清試料は全て、ＩＤＥＸＸ　ＨｅｒｄＣｈｅｋ（登録商標）ＰＲＲＳ２ＸＲ　ＥＬＩＳＡ及びウイルス中和反応アッセイ（ＶＮ）を使用して、抗ＰＲＲＳＶ抗体について評価した。これらの検査も、厳密な品質保証ガイドラインに従ってＳＤＳＵ－ＡＤＲＤＬにおいて日常的に実施されている。

【００５２】

ウイルスを受容したブタは全て感染し、感染は、血清中のウイルスＲＮＡの有無に関するＲＴ－ＰＣＲの結果が陽性であること、及び血清学的検査により判明した。血清中のウイルスは、約１４感染後日数（ｄｐｉ）時にピークに達した（図５Ａ；表３）。１４ｄｐｉで、クローンウイルス群の６頭中５頭のブタ、親ウイルス群の５頭中４頭のブタ、及びワクチン群の５頭のブタ全てが、血清転換した（図５Ｂ；表３）。クローンウイルス負荷群の６頭中４頭のブタは、２１ｄｐｉに検出可能な中和抗体力価を示し、親負荷群の５頭中１頭のブタは、２１ｄｐｉまでに中和抗体を誘発した。ＭＬＶワクチン負荷群のブタのうち２頭は、４２ｄｐｉに検出可能な中和抗体力価を生じさせた（表３）。

【００５３】

表３．異なる感染後日数（ｄｐｉ）で接種されたブタの血清の血清学的結果及びＰＣＲ結果の要約

【表３】

dpi	親ウイルス			クローンウイルス			MLVワクチン		
	PCR[a]	ELISA[b]	VN[c]	PCR[a]	ELISA[b]	VN[c]	PCR[a]	ELISA[b]	VN[c]
0	0/5	0/5	0/5	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5
7	4/5	1/5	0/5	5/6	0/6	0/6	5/5	0/5	0/5
14	4/5	4/5	0/5	6/6	5/6	0/6	5/5	5/5	0/5
21*	5/5	5/5	1/5	6/6	5/6	4/6	5/5	5/5	0/5
28	2/3	3/3	2/3	4/4	4/4	2/4	3/3	3/3	0/3
35	1/3	3/3	2/3	2/4	4/4	2/4	3/3	3/3	0/3
42	0/3	3/3	3/3	1/4	4/4	2/4	2/3	3/3	2/3

[a]ＰＣＲ：リアルタイムＰＣＲにより決定された各群のブタのＰＣＲ陽性を示すブタの頭数／各群のブタの総頭数；[b]ＥＬＩＳＡ：ＩＤＥＸＸ　ＨｅｒｄＣｈｅｋ（登録商標）ＰＲＲＳ　２ＸＲ　ＥＬＩＳＡによって決定された各群のブタの血清反応陽性ブタの頭数／各群のブタの総頭数；[c]ＶＮ：蛍光焦点中和アッセイによって決定された、ブタの中和抗体応答を誘発したブタの頭数／ブタの総頭数。結果は、ウイルス感染の９０％低減と解釈された。

＊２頭のブタは、急性感染を分析するために２１日目に安楽死させた。

【００５４】

偽感染ブタは全て、研究期間中にわたって陰性のＲＴ－ＰＣＲ及びＰＲＲＳＶ抗体のままだった。著しい臨床的徴候は、感染ブタのいずれにも観察されなかった。軽症間質性肺炎等の、ＰＲＲＳＶに特徴的な軽度の病理学的肺病変のみが、クローンウイルス群の６頭中３頭のブタで、親ウイルス群の５頭中５頭のブタで、及びワクチン群の５頭中２頭のブタで観察された。残りのブタは、肉眼的な肺病変を示さなかった（表４）。興味深いことには、異なる群のブタで病理学的病変を比較すると、病変スコアは、親ウイルスに感染したブタにおいてわずかにより高いと考えられる。

【００５５】

表４．感染ブタの肉眼的肺炎病変を有する肺のパーセンテージ

【表４】

ブタ番号	肉眼的肺病変スコア(%)*			
	クローンウイルス	親ウイルス	MLVワクチン	偽対照
#1	0	0.6	0.7	0
#2	1.0	0.5	0	0
#3	0.9	10.5	0	0
#4	0	2.1	0.3	0
#5	0	3.25	0	0
#6	1.5	該当無し	該当無し	該当無し

＊肉眼的肺病理は、肺の各肺葉を％肺炎について評価した肉眼的ブタ肺病変スコア方式を使用することにより評価し、各肺葉の％肺炎は、肺全体について加算されている（１０）。

【００５６】
伝染性クローンのＮｓｐ２領域への緑色蛍光タンパク質の導入
本発明者らは、この伝染性クローンを外来遺伝子発現に使用する可能性を検討した。以前の研究により、Ｎｓｐ２は、外来遺伝子挿入のための優れた候補部位であることが示された。１型及び２型は両方とも、Ｎｓｐ２のＣ末端領域にアミノ酸挿入及び欠失を含む超可変ドメインを含有している（７、８、２７）。ＳＤ０１－０８と、ヨーロッパ１型ウイルスの原型メンバーであるＬＶとの間の主要な違いの１つは、Ｎｓｐ２における１７個のアミノ酸欠失の存在であり、その欠失は、ＬＶのＯＲＦ１のアミノ酸７３４から７５０の間に位置している。本発明者らは、Ｎｓｐ２のこの固有欠失部位に緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を挿入した（ＳＤ０１－０８　ＯＲＦ１ａのアミノ酸７３３／７３４において、図７）。構築体、ｐＳＤ０１－０８－ＧＦＰを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写し、ＢＨＫ－２１細胞に形質移入した。生菌細胞を、形質移入４８時間後に蛍光顕微鏡で直接的に検査した。形質移入されたＢＨＫ細胞からの細胞培養上清を、ＭＡＲＣ－１４５細胞で継代し、その結果ＧＦＰ発現細胞が出現し、それは早くも感染６時間後には明白に視覚化することができた（図６Ａ）。感染４８時間後に、ＧＦＰ－Ｎｓｐ２融合タンパク質の発現を確認するために、細胞を固定し、Ｎｓｐ２特異的ｍＡｂ　ＥＳ３－４　５８－４６で染色した。ＥＳ３－４　５８－４６は、ＧＦＰ挿入部位の直ぐ上流に配置されているＥＳ３エピトープ配列（図７）から作られた合成ペプチドでマウスを免疫することにより作製された。赤色蛍光性Ｃｙ３をコンジュゲートさせたヤギ抗マウスＩｇＧを、二次抗体として使用した。共焦点顕微鏡法により、ＧＦＰ及びＮｓｐ２の両方が核周囲に局在化し、親ウイルスのＮｓｐ２局在化に類似していたことが示された（図６Ｂ及び６Ｃ）。ＧＦＰ発現がウイルス複製に影響を与えるかどうかを決定するために、ＧＦＰウイルスの増殖特徴を、親野生型ウイルス及びクローンウイルスと比較した。ｐＳＤ０１－０８－ＧＦＰウイルスの複製サイクルは、４８ｈｐｉでウイルス力価がピークに達することを含み、他のウイルスに類似していたが、ＧＦＰウイルス感染のピーク力価は、およそ１０分の１に低減した（図３）。

【００５７】
複数回のウイルス複製にわたるＧＦＰ発現の安定性を調査するため、ＧＦＰウイルスをＭＡＲＣ－１４５細胞で８回連続継代した。７代目の継代までに、非ＧＦＰ発現ウイルスの亜集団が出現し、全ウイルス集団の１５％と計数された。更にＧＦＰ喪失をＲＴ－ＰＣＲで分析した。全細胞ＲＮＡを、ＧＦＰウイルスの７代目継代に感染した細胞から単離し、ＲＮＡを、ＧＦＰ挿入領域を増幅したプライマーを用いたＲＴ－ＰＣＲ反応におけるテンプレートとして使用した。ＲＴ－ＰＣＲ産物を、クローニングし、配列決定した。その結果は、ＧＦＰのＮ末端アミノ酸１～１５９が欠失していたことを明らかにした（図７）。より興味深いことには、アミノ酸１～１５９が欠失していた一方で、２個のアミノ酸、メチオニン（Ｍ）及びグルタミン酸（Ｅ）が、ウイルスによってＧＦＰアミノ酸１６０の前に挿入されていた（図７）。従って、ＧＦＰ遺伝子の欠失をコードするウイルスゲノムの選択が、ＧＦＰを発現する感染細胞の割合を低下させたことが説明された。まとめると、これらの結果は、Ｎｓｐ２領域が外来遺伝子の導入を許容できることを示す。しかしながら、外来遺伝子の挿入は、ウイルス複製のレベルを低減する。このように、陽性マーカー、ＧＦＰ遺伝子は、安定していなかった。

【００５８】
ＩＩ．陰性マーカーウイルスＧＦＰ／ΔＥＳ４
ＧＦＰ／ΔＥＳ４陰性マーカーワクチンの構築
有望な陰性マーカーワクチンウイルスを取得するために、ＧＦＰの下流に（ＳＤ０１－０８ウイルスゲノムのヌクレオチド２４２７から２５９１に）位置するＢ細胞エピトープ、ＥＳ４を、プライマー対ΔＥＳ４Ｆ／Ｅ３４４８Ｒ及びＥ１８９５Ｆ／ΔＥＳ４Ｒを使用して、オーバーラップ伸長ＰＣＲ技術（Ｈａｙａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４）で欠失させた（表５）。ＰＣＲ産物をＲｓｒｌ１及びＥｃｏＲＶ制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化したｐＳＤ０１－０８－ＧＦＰプラスミドにライゲーションした。その結果

生じたプラスミド構築体を、ｐＳＤ０１－０８－ＧＦＰ／ΔＥＳ４と命名する（図８）。

【００５９】

表５．ＥＳ４エピトープ欠失及びＥＬＩＳＡ抗原発現に使用したプライマー

【表５】

プライマー名	配列*	SD01-08におけるゲノム位置@
ΔES4F	5’ **caa g**tc ctc tac agg gcc cat act c **配列番号** 32	2421 - 2426 2592 - 2606
ΔES4R	5’ ggc cct gta gag ga**c ttg tac agc tc** **配列番号** 33	2421 - 2426 2592 - 2599
E1895F	5’ ctt gct gat cc acct cct cag g **配列番号** 34	1905 - 1926
E3448R	5’ ccg tcg gag ggg gtg gca tcc **配列番号** 35	3377 - 3397
Nsp2-2144F	5’ gtc tgt gtc ctt gga cga gtg **配列番号** 36	2144 - 2164
Nsp2-2694R	5’ cca agc ggc caa gga tag atc **配列番号** 37	2694 - 2714
pET-EGFP-F	5’ cg*g gat cc***a tgg tga gca agg gcg agg agc** **配列番号** 38	–
pET-EGFP-R	5’ cct *aag ctt* **cct tgt aca gct cgt cca tgc cg** **配列番号** 39	–
pET-ES4F1	5’ gc *aga tct* tca gac tcc aag aga gaa **配列番号** 40	2427 - 2444
pET-ES4F2	5’ gc *aga tct* ggt ggt ggt ggt tcc tca gac tcc aag aga gaa **配列番号** 41	2427 - 2444
pET-ES4R	5’ at ccc *aag ctt* gcg *ggg atc c*cg gga caa atc ctc g **配列番号** 42	2577 - 2591

＊ＧＦＰのヌクレオチドは太字、制限酵素部位は下線のイタリック体；

@付番は、ＳＤ０１－０８ゲノム内のヌクレオチド位置に対応する。

【００６０】

図８は、ｐＳＤ０１－０８－ＧＦＰ／ΔＥＳ４構築体の略図である。ＧＦＰは、ＯＲＦ１ａのアミノ酸７３３と７３４との間に挿入され、ＧＦＰの下流に（アミノ酸７３６から７９０に）位置していた免疫原性Ｂ細胞エピトープ、ＥＳ４を、ＳＤ０１－０８ウイルスから欠失させた。このプラスミドＤＮＡをＢＨＫ－２１細胞に直接形質移入すると、ウイルス複製の完全なサイクルが開始される。感染４８時間後に得られたＢＨＫ－２１細胞からの細胞培養上清を、ＭＡＲＣ－１４５細胞で継代して、伝染性子孫ウイルスを回収し、その結果生じたウイルスを、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスと命名した。親ウイルス、ＳＤ０１－０８を、ｐＳＤ０ｌ－０８ｃＤＮＡクローンと並行して作製した。ＭＡＲＣ－１４５細胞に由来するウイルスの継代２を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏ特徴付けに使用した。

【００６１】

増殖速度論研究により、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスは、わずかに遅い速度論で複製し、親ウイルス、ＳＤ０１－０８より数時間後に最大力価に達したことが示された。マーカーウイルスのピークウイルス力価（３．３４×10^4ＦＦＵ／ｍｌ）は、親ウイルス（２．５６×10^6ＦＦＵ／ｍｌ）より、およそ２ｌｏｇ分だけ低力価だった（図９）。図９は、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスの増殖速度論を表す。並行して、ＭＡＲＣ－１４５細胞を、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルス及び親ウイルスの継代３に０．１ＭＯＩで感染させた。０、６、１２、２４、３６、４８、６０、及び７２感染後時間で細胞を回収し、ウイルス力価をＭＡＲＣ－１４５細胞でのＩＦＡにより決定した。その結果は３回反復実験の平均値であり、ウイルス力価は、１ミリリットル当たりの蛍光焦点単位（ＦＦＵ／ｍｌ）として表した。マーカーウイルス及び親ウイルス間のプラーク形態を、Ｍ

ＡＲＣ－１４５細胞でのプラークアッセイにより比較した。ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスによって形成されたウイルスプラークのサイズは劇的に低減し、ほとんどのプラークは針先サイズであり（図１０）、ＧＦＰ挿入／ＥＳ４欠失が、感染中の細胞間伝播速度に負の効果を与えたことを示唆する。図１０は、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルス（１０－１）及び親ウイルス（１０－２）のプラーク形態を示す。コンフルエント細胞単層を、０．１ＭＯＩのウイルスに感染させた。２時間後、細胞培養上清を取り除き、寒天重層をアプライした。３７℃で５日後にプラークを検出し、０．１％クリスタルバイオレットを使用して染色した。

【００６２】

組替えウイルスにおけるＧＦＰ挿入又はＥＳ４欠失のｉｎ　ｖｉｔｒｏ安定性を、ＭＡＲＣ－１４５細胞で１０代の連続継代（各継代は、７２時間のインキュベーション）をしている間、追跡した。継代１０のウイルスのＧＦＰ／ΔＥＳ４領域を配列決定した。意外にも、Ｎ末端１５９アミノ酸の欠失を経験した以前のＳＤ０１－０８－ＧＦＰウイルスとは異なり、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスのＧＦＰは、全長遺伝子として完全なままであり、ＥＳ４欠失は依然として存在していた。この結果は、ＥＳ４エピトープ領域の欠失が、挿入された外来遺伝子、ＧＦＰの安定性を向上させたことを示す。小集団の感染細胞がＧＦＰ関連蛍光を失ったことが識別された（図１１）。ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスの継代１０に感染させたＭＡＲＣ－１４５細胞のＧＦＰ発現が、１１－１に示されている。ＡｌｅｘｉＦｌｕｏｒ標識抗ヌクレオカプシドモノクローナル抗体、ＳＤＯＷ１７（Ｎｅｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３）で染色された同一ウイルス焦点が、１１－２に示されている。ＧＦＰ蛍光を失ったウイルスの集団が、円内に示されている。

【００６３】

ＧＦＰ／ΔＥＳ４領域の場合、本発明者らは、３回独立反復のＰＣＲ及び配列決定（順方向及び逆方向の両方）を実施した。従って、合計６つの配列を取得した。それらの配列の１つでは、ヌクレオチドＣ－２８９からＴ－２８９への突然変異が同定され、それは、ＧＦＰの９７位にアルギニンからシステインへのアミノ酸突然変異を引き起こし、ＧＦＰ関連蛍光を失った小集団の感染細胞に対応している可能性がある（図１２）。他の５つの配列では、突然変異は検出されなかった。図１２は、Ａｒｇ－９７変異ＧＦＰ遺伝子と比較した野生型ＧＦＰ遺伝子の電気泳動図を表す図である。ＧＦＰ挿入領域を、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスの細胞培養継代１０から配列決定した。アミノ酸は一文字コードで示されており、太字はＣＧＣ（Ａｒｇ）からＴＧＣ（Ｃｙｓ）への変異アミノ酸を示す。

【００６４】

ＥＳ４及びＧＦＰ抗原発現

ＥＳ４抗原は、以前に記述されている修飾方法（Ｓｕｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）を使用して、タンデムリピートＥＳ４エピトープとして発現させた。手短かに言えば、ＥＳ４エピトープ（ＳＤ０１－０８のＯＲＦ１ａのアミノ酸７３６～７９０）の３つのコピーを、タンパク質発現ベクター、ｐＥＴ－２８ａ（＋）（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に構築した。可動性ペプチドリンカー、ＧＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＴＴＣＣを、エピトープ間に付加して、エピトープ提示を支援した。２つの順方向プライマーがあった。順方向プライマー１、ｐＥＴ－ＥＳ４Ｆ１は、ＢｇｌＩＩ制限部位を含有していたが、リンカー配列は含有せず、一方、順方向プライマー２、ｐＥＴ－ＥＳ４Ｆ２は、ＢｇｌＩＩ制限部位だけでなくリンカー配列も含有していた。まず、ＥＳ４遺伝子断片を、順方向プライマー１及び逆方向プライマー、ｐＥＴ－ＥＳ４Ｒで増幅した。ＰＣＲ産物をＢｇｌＩＩ及びＨｉｎｄＩＩＩで消化し、その後ＢａｍＨＩ及びＨｉｎｄＩＩＩで消化したｐＥＴ－２８ａにクローニングした。このクローンを、ｐＥＴ－２８ａ－ＥＳ４（＋１）と命名した。ＥＳ４の第２のコピーを、順方向プライマー２及び逆方向プライマー、ｐＥＴ－ＥＳ４ＲでＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ産物をＢｇｌＩＩ及びＨｉｎｄＩＩＩで消化し、その後ＢａｍＨＩ及びＨｉｎｄＩＩＩで消化したｐＥＴ－２８ａ－ＥＳ４（＋１）にクローニングした。ＥＳ４の第３のコピーを、第２のコピーと同じ戦略を使用して挿入した。最終構築体を、ｐＥＴ－２

８ａ－ＥＳ４（＋３）と命名した。ＧＦＰ遺伝子を、プライマー対ｐＥＴ－ＥＧＦＰ－Ｆ／ｐＥＴ－ＥＧＦＰ－Ｒを用いて、ｐＥＧＦＰ－Ｎ１プラスミド（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）から増幅した。ＰＣＲ産物を、ＢａｍＨＩ及びＨｉｎｄＩＩＩ制限酵素で消化し、同じ酵素で消化したｐＥＴ－２８ａベクターにライゲーションした。組換えタンパク質を、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）で発現させ、Ｎ末端に６個のヒスチジン残基を有する融合タンパク質を産生した。このタンパク質を、本発明者らの以前の論文（Ｆｅｒｒｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００４）に記述されるように、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーで精製し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析した。

【００６５】

ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスのｉｎ ｖｉｖｏ特徴付け

ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスのｉｎ ｖｉｖｏ特徴を、育仔場ブタ疾患モデルで研究した。１８頭の４週齢ブタを、ＰＲＲＳＶ未感染群れから購入した。動物を、無作為に３群に分割（ｎ＝６／群）し、実験的接種開始前の順応期間を７日間としたＢＬ２隔離条件下で収容した。群１のブタをＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスに感染させ、群２のブタを陽性対照として親ＳＤ０１－０８ウイルスに感染させ、群３のブタを細胞培養培地で偽感染させた。群１及び群２のブタに、1×10^{6} ５０％組織培養感染量（$TCID_{50}$）のウイルスを、鼻腔内及び筋肉内部位の両方を介して接種した（各部位について、１ｍｌ）。４２感染後日数（ｄｐｉ）時に、群１及び群２のブタを、異種性１型株、ＳＤ０３－１５ウイルスで負荷した。

【００６６】

ＳＤ０３－１５は、別の米国１型株であり、２００３年に本発明者らの診断実験室に提出された臨床試料から単離された。現地報告では、ＳＤ０３－１５に感染したブタは、３週間で８０～９０％の離乳前死亡率を経験した。全身状態の低下は、終末期まで継続した。成体雌ブタの集団では、以前の米国ＰＲＲＳＶ流行と比較して軽度の流産急性発症があった。本発明者らの以前の実験動物研究は、このウイルスの病原性の性質も実証した（Ｌａｗｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｃｏｎｆ．Ｒｅｓ．Ｗｏｒｋ．Ａｎｉｍ．Ｄｉｓ．，ａｂｓｔｒ．９９，２００５）。

【００６７】

群３の３頭のブタをＳＤ０３－１５ウイルスで負荷し、他の３頭のブタを偽感染対照として残した。感染後の最初の７日間及び負荷後の最初の７日間、ブタの臨床的徴候及び体温を毎日観察した。異なる負荷群間の平均体温応答を比較した。直腸温を、負荷の１日前及び負荷７日後に測定した。初期感染後、温度上昇はいずれのブタでも検出されず、臨床的徴候は観察されなかった。負荷後、群３（初期偽感染）のこれら３頭の負荷したブタの直腸温が、負荷１日及び２日後に上昇した（図１３）。臨床的徴候（咳嗽及び鼻汁）も、これら３頭のブタで観察された。残りのブタは無症候性のままだった。血液試料を、全てのブタから週１回取得した。ブタを、負荷２１日後に安楽死させた。研究動物の肉眼的肺病変を、各葉が全肺に寄与する近似容積に基づく以前に開発した方式を使用して評価した：左及び右頂葉、左及び右心臓葉、及び各中葉は、各々全肺容積の１０％を寄与し、左及び右尾部側葉は各々２５％を寄与する。その後、これらのスコアを使用して、各葉の相対的寄与に基づく合計肺病変スコアを算出した（Ｈａｌｂｕｒ ｅｔ ａｌ，１９９５）。剖検では、肉眼的な病理学的病変は、群１、群２、及び３頭の厳格な陰性対照ブタには観察されなかった。対照的に、ＰＲＲＳＶに特徴的な軽度の肉眼的な病理学的肺病変が、最初に偽感染させその後ＳＤ０３－１５で負荷した、群３のそれら３頭のブタに観察された。

【００６８】

ウイルス学的及び免疫学的特性

ｉｎ ｖｉｖｏでのマーカーウイルスのウイルス学的及び免疫学的特性を決定した。図１４Ａ～１４Ｃにおいて垂直の点線として示されているように、ブタを４２ｄｐｉで負荷した。ウイルス血症の期間及び高さをリアルタイムＰＣＲで決定し、その結果を、１ｍｌ当たりのＲＮＡコピー数として解釈した。感染後は毎日、異なる頭文字（Ａ、Ｂ、又はＣ

）で示す平均ウイルス負荷は、有意に異なる（Ｐ＜０．０５）。親ウイルスに感染した群２のブタと比較すると（ピーク平均ウイルス力価＝５．９×１０^{7}コピー／ｍｌ）、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスに感染したブタは、より低いピークウイルス負荷を示した（ピーク平均ウイルス力価＝２．０８×１０^{5}コピー／ｍｌ、図１４Ａ）。負荷後７日目では、ウイルス負荷は、最初に偽感染させその後ＳＤ０３－１５ウイルスで負荷したそれらのブタより、２から３ｌｏｇだけ低かった。負荷後２１日目までに、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスに感染した群のブタは、親群と比較して１０倍低いウイルス負荷を示し、３／５頭のブタは、血清中のウイルスを撲滅した（図１４Ａ；表６）。

【００６９】

表６．遺伝子的に異なる株、ＳＤ０３－１５での負荷後２１日目に定量ＰＣＲで測定した血清中のウイルス負荷

【表６】

ブタ番号	血清中のウイルス負荷 (コピー/ml)			
	GFP/ΔES4	親	陰性 / 負荷*	陰性
1	0	2.7E + 02	該当無し	0
2	7.4E + 02	0	該当無し	0
3	0	1.2E + 04	該当無し	0
4	該当無し	0	3.6E + 04	該当無し
5	0	2.6E + 03	3.3E + 04	該当無し
6	1.7E + 02	1.1E + 04	3.6E + 04	該当無し
平均	**1.8E + 02**	**4.3E + 03**	**3.5E + 04**	**0**

＊４２ｄｐｉに異種性株、ＳＤ０３－１５で負荷された陰性群のブタのうちの３頭。

【００７０】

１４ｄｐｉまでに、感染群のブタは全て血清転換した。ＰＲＲＳＶ特異的血清抗体を、ＩＤＥＸＸ　ＨｅｒｄＣｈｅｋ（登録商標）ＰＲＲＳＶ　ＥＬＩＳＡ　２ＸＲキットで測定した。０．４を超えるＳ／Ｐ比が、陽性とみなされる。抗体反応は、２１ｄｐｉ後、同じようなレベルに達した（図１４Ｂ）。

【００７１】

ウイルス中和抗体応答を、蛍光焦点中和アッセイによって決定した（図１４Ｃ）。結果をウイルス感染の９０％低減として解釈し、中和抗体力価を、$\log_2$目盛りでの平均値（ｎ＝６）として表した。親ＳＤ０１－０８ウイルスを、ウイルス中和アッセイに使用した。感染後は毎日、異なる頭文字（Ａ、Ｂ、又はＣ）で示す平均は、有意に異なる（Ｐ＜０．０５）。血清中和（ＳＮ）抗体レベルを更に測定すると、親ウイルスに感染したブタでは、感染後２１日目までに６頭中１頭のブタからＳＮ抗体が検出され、感染後３５日目までには、３／６頭のブタが、平均幾何平均力価（ＧＭＴ）が２に達した検出可能なＳＮ力価を示したことが示された。対照的に、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスで感染させたブタでは、より速くより高い中和抗体応答が発生した。感染後１４日目までに、６頭中１頭のブタからＳＮ抗体が検出され、ＳＮ力価は、この群にブタの全てから検出され、感染後３５日目までに平均ＧＭＴが９．２に達した。ＳＤ０３－１５で負荷した後、効果の増加が観察され、４９ｄｐｉ（負荷１週間後）では、親ウイルス感染群のＧＭＴが５．７であるのに対して、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルス感染群のＧＭＴは１８．４であった。両群は、６２ｄｐｉ（負荷３週間後）で同じようなＳＮ力価に達した（図１４Ｃ）。これらのデータは、初期感染においては、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスに感染したブタが、親ウイルスに感染したブタより高い中和抗体力価を発生させたことを示唆する。

【００７２】

ウイルス単離及び配列決定

７、１４、２１、及び２８ｄｐｉの血清試料を、以前の記述のようにウイルス単離に使

用した（Ｗａｓｉｌｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。ウイルスの存在を、ＰＲＲＳＶ特異抗体、ＳＤＯＷ１７を用いたＩＦＡで確認した（Ｎｅｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３）。ＧＦＰ挿入及びＥＳ４エピトープ欠失の安定性を決定するために、ウイルスＲＮＡを、製造業者の説明書に従ってＱＩＡａｍｐウイルスＲＮＡミニキット（Ｑｉａｇｅｎ社製）を使用し、血清単離ウイルスから抽出した。ＲＴ－ＰＣＲを、以前に記述されている方法を使用して実施した（Ｆａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。ＲＴ－ＰＣＲ増幅断片をゲル精製し、配列は、アイオワ大学配列決定所（Ｉｏｗａ　Ｓｔａｔｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｆａｃｉｌｉｔｙ）（エイムズ、米国アイオワ州）において決定された。プライマー対ｎｓｐ２－２１４４Ｆ／ｎｓｐ２－２６９４Ｒ（表５）をＲＴ－ＰＣＲ及び配列決定に使用し、ＧＦＰ挿入及びＥＳ４欠失を含有するヌクレオチド領域（ＳＤ０１－０８ゲノムの２１４４から２６９４）を増幅した。ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスの全長配列は、配列番号４３に示されている（表７）。

【００７３】

ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーのｉｎ　ｖｉｖｏ安定性

ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーの安定性を決定するために、７から２８ｄｐｉまでの血清試料を、ＭＡＲＣ－１４５細胞でのウイルス単離に使用した。７、１４、及び２１ｄｐｉに収集した血清試料からウイルスを回収し、ウイルスは、２８ｄｐｉから収集した血清試料からは単離されなかった。細胞培養物中で、本発明者らは、７及び１４ｄｐｉから単離したウイルスを有する感染細胞の小集団が、弱いＧＦＰ蛍光を示すことのみを観察し、ＧＦＰ蛍光は、２１ｄｐｉから単離したウイルスを有する感染細胞では観察されなかった。しかしながら、ヌクレオカプシドタンパク質特異的モノクローナル抗体、ＳＤＯＷ１７を使用した免疫蛍光染色により、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ研究で観察されたのと同様に、大集団のウイルスの存在が確認された（図１１）。ＧＦＰ挿入／ΔＥＳ４欠失の安定性を、対応する領域を配列決定することにより決定した。その結果により、ＥＳ４欠失が存在し、ＧＦＰは全長遺伝子として完全なままだったことが確認された。しかしながら、配列決定の結果により、ＧＦＰのヌクレオチド１４４（ＣからＴ）及びヌクレオチド２８９（ＣからＴ）に位置した２つの点突然変異が明らかになった。ヌクレオチド１４４突然変異はサイレントであったが、ヌクレオチド２８９突然変異は、ＧＦＰの９７位においてアルギニン（Ｒ）からシステイン（Ｃ）へのアミノ酸突然変異を引き起こし、それは本発明者らのｉｎ　ｖｉｔｒｏ配列決定分析と一致する（図１２）。興味深いことには、７及び１４ｄｐｉから単離したウイルスには、非突然変異ＧＦＰ遺伝子の小集団が依然として検出された。各ｄｐｉについて、本発明者らは、３頭のブタから単離したウイルスを配列決定し、配列決定は順方向及び逆方向プライマーの両方を使用して実施し、その結果、各ｄｐｉにつき合計６つの配列がもたらされた。７ｄｐｉから単離したウイルスの場合、１／６の配列は、９７位に突然変異を有していないことが見出され、他の５つの配列は、ＲからＣへの突然変異を含有することが決定された。１４ｄｐｉから単離したウイルスの場合、２／６の配列で突然変異が同定されず、これらの２つの配列は２頭の異なるブタに由来していた。他の４つの配列でも、ＲからＣへの突然変異が含有されていると同定された。２１ｄｐｉのウイルスからもたらされた配列は全て、ＲからＣへの突然変異を含有していた。このデータは、ＧＦＰ蛍光が失われるのはＲからＣへの突然変異のためであるという以前の報告（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）と一致していた。小集団の非突然変異ＧＦＰが存在することは、弱い蛍光を発する細胞が細胞培養物中で観察されたことを説明するだろう。これらの結果は、選択が徐々に起こって、ウイルス複製の向上に好ましい突然変異が生じた可能性を示唆する。

【００７４】

ＧＦＰ及びＥＳ４エピトープに基づくＥＬＩＳＡ

ＥＬＩＳＡは、Ｉｍｍｕｌｏｎ　ＩＩ　ＨＢ９６ウェルマイクロタイタープレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｌａｂｓｙｓｔｅｍｓ社製、フランクリン、米国マサチューセッツ州）を使用して実施した。組換えタンパク質を、コーティング緩衝液（１５ｍＭ炭酸ナトリウム－３５ｍＭ重炭酸ナトリウム、ｐＨ９．６）で希釈し、プレートのコラム１、３、５、７、

９、及び１１を、１００μｌの希釈抗原でコーティングした。コラム２、４、６、８、１０、及び１２を、バックグラウンド対照として１００μｌのコーティング緩衝液で処理した。プレートを３７℃で１時間インキュベートし、その後、過剰のタンパク結合部位を、ＰＢＳＴ緩衝液（０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を有する１×ＰＢＳ）中の１０％ミルクで、終夜４℃でブロッキングした。試験血清を、５％ミルクを有するＰＢＳＴ緩衝液中に１：５希釈で添加した。３７℃で１時間のインキュベーション後、プレートをＰＢＳＴで洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートしたヤギ抗ブタＩｇＧ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製、ゲーサーズバーグ、米国メリーランド州）を、プレート上の抗原に結合している任意のＰＲＲＳＶ血清抗体に結合させるために添加した。プレートを３７℃で更に１時間インキュベートし、洗浄し、ペルオキシダーゼ基質ＡＢＴ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製、ゲーサーズバーグ、米国メリーランド州）を、発色のために添加した。発色は、ＸＣｈｅｋソフトウェア（ＩＤＥＸＸ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）によって制御されたＥＬ８００マイクロプレートリーダ（ＢｉｏＴｅｋ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｉｎｃ．社製、ウィヌースキー、米国バーモント州）を用いて、４０５ｎｍで読み込むことにより定量化した。

【００７５】

携帯鑑別診断アッセイを、マーカーワクチンで予防接種を受けた動物と、野外ウイルスに自然感染した動物とを区別するために開発した。２つのマーカー、ＧＦＰ挿入（陽性マーカー）及びＥＳ４欠失（陰性マーカー）を使用したため、本発明者らは、ＧＦＰ及びＥＳ４エピトープ両方に基づくＥＬＩＳＡアッセイをマーカー検出のために開発した。ＧＦＰ及びＥＳ４エピトープの両方は、可溶性組換えタンパク質として発現された。本発明者らは、特異的抗体検出用のこれら２つのＥＬＩＳＡ検査を評価した。図１５Ａは、ＥＳ４エピトープに基づくＥＬＩＳＡからの結果を示し、図１５Ｂは、ＧＦＰ抗原に基づくＥＬＩＳＡからの結果を示す。図１５Ａにおいて垂直の点線として示されているように、ブタを感染後４２日目に負荷した。予想した通り、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスでの群１ブタの感染は、欠失ＥＳ４エピトープに対する検出可能な抗体応答を誘導しなかったが（図１５Ａ）、ＧＦＰ抗原に対する強い抗体応答を誘導し、それは１４ｄｐｉから始まり、６２ｄｐｉまでの研究期間中継続した（図１５Ｂ）。対照的に、親ウイルスに感染した群２ブタでは、ＥＳ４組換えタンパク質に特異的な抗体を２１ｄｐｉで検出することができ、これも６２ｄｐｉまで続いたが（図１５Ａ）、ＧＦＰ抗原に対する特異的抗体応答は検出されなかった（図１５Ｂ）。０３－１５ウイルスはＥＳ４エピトープを含有しているため、０３－１５で負荷された後、群１ブタは、ＥＳ４エピトープに対する検出可能な抗体反応を負荷１週間後に示した（図１５Ａ）。３頭の厳格な陰性対照ブタに由来する血清試料についての特異的抗体応答は、ＧＦＰ及びＥＳ４エピトープの両方に基づくＥＬＩＳＡでは、検出されなかった（図１５Ａ及び１５Ｂ）。

【００７６】

他の１型及び２型ＰＲＲＳＶ罹患動物に由来する血清試料

陰性マーカーの基本的な必要条件は、抗原性領域が、多岐にわたる野外ウイルスと反応可能であるべきだということである。ＥＳ４エピトープが種々のウイルス株において反応性であり得ることを保証するために、本発明者らは、米国１型ウイルス、ＳＤ０１－０７、ＳＤ０１－０８、ＳＤ０２－１１、及びＳＤ０３－１５の４つの代表的な株の各々で感染させたブタに由来する血清試料を使用した（Ｌａｗｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｐｒｏｃ．Ｃｏｎｆ．Ｒｅｓ．Ｗｏｒｋ．Ａｎｉｍ．Ｄｉｓ．，ａｂｓｔｒ．９９，２００５）。ＳＤ０１－０７及びＳＤ０１－０８分離株を、臨床的疾患を示していない群れから取得し、ＳＤ０２－１１及びＳＤ０３－１５を、若いブタで相当の罹患率及び死亡率を示す群れから取得した。これらの４つの分離株も、米国起源の１型ＰＲＲＳＶ分離株用に作成された系統樹の異なる分岐に分類される（Ｆａｎｇ　ｅｔ　ａｌ，２００７）。２型ウイルス、ＶＲ２３３２に感染した実験ブタに由来する血清試料を、ＰＲＲＳＶ共同農業プロジェクト（ＰＲＲＳＶ　Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ　Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒｅ　Ｐｒｏｊｅｃｔ）（

ＣＡＰ）の共有試薬資産から取得した。図１５Ｃに示されるように、ＥＳ４エピトープは、これら４つのウイルス株に感染したブタに由来する抗血清と全て反応した。結果は、平均値（ｎ＝６）として示されている。抗体反応は、１４ｄｐｉまでに検出され、６２ｄｐｉを越えて続いた。しかしながら、２型原型株、ＶＲ２３３２に感染した実験ブタの群に由来する血清試料を更に検査すると、ＥＬＩＳＡではＥＳ４エピトープと反応しないことが示された（データ非表示）。従って、１型ウイルスに感染した動物と、２型ウイルスに感染したそれらの動物とを区別するためには、別の血清学的検査が必要とされるだろう。

【００７７】

ＩＩＩ．考察

ＰＲＲＳウイルスのｎｓｐ２領域の２つの遺伝子マーカーを構築した。陽性マーカー（ＧＦＰ挿入）は、予防接種を受けた動物の検出を可能にし、陰性マーカー（ＥＳ４エピトープ欠失）は、動物における野生型ウイルスの存在を検出可能にする。従来の多重細胞培養継代技術によって調製されたＭＬＶと比較すると、このタイプの厳密に定義された弱毒化欠失／挿入を使用して構築したワクチン、及び逆遺伝学技術の使用は、有毒な野生型ウイルスへの復帰変異の潜在的リスクを低減する。

【００７８】

マーカーワクチンは、予防接種レベルをモニターし、感染の空間的経過を追跡するための好適な検査（携帯診断検査）が利用可能な場合にのみ、有用である。ＧＦＰ抗原に基づくＥＬＩＳＡは、マーカーウイルスに感染したブタの群に高レベルの抗ＧＦＰ応答を検出した。ＥＳ４エピトープに基づくＥＬＩＳＡも、親ウイルスに感染したブタの群に高レベルの抗体応答を検出したが、抗ＧＦＰ応答のＥＬＩＳＡより遅延して発色すると考えられる。マーカーウイルスに感染したブタにおける高レベルの堅牢な抗ＧＦＰ応答は、１４ｄｐｉまでに検出することができるが、野生型ウイルスに感染したブタにおける抗ＥＳ４抗体応答は、２１ｄｐｉまでに検出され、２８ｄｐｉまでにより高いレベルに達した。ＥＳ４エピトープは、１型ウイルスのｎｓｐ２に同定された（Ｏｌｅｋｓｉｅｗｉｃｚ ｅｔ ａｌ．，２００１）６つのＢ細胞エピトープ中最も高い親水性値（Ｈｏｐｐ ＆ Ｗｏｏｄｓ，１９８１）を有する。現在入手可能な１型ＰＲＲＳＶのｎｓｐ２アミノ酸配列（Ｍｅｕｌｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ，１９９３；Ｆａｎｇ ｅｔ ａｌ，２００７）を分析することにより、この領域は、１型遺伝子型内で６３．６％から１００％のアミノ酸配列同一性を有することが示された。タンパク質配列分析により、ＥＳ４エピトープ領域、ＡＡ７３６～ＡＡ７９０は、実際に７つの小さなＢ細胞エピトープを含有していることが示された（Ｐｅｐ Ｔｏｏｌ、Ｂｉｏ Ｔｏｏｌｓ，Ｉｎｃ．社製、エドモントン、アルバータ州、カナダ）。エピトープＡＡ７４５～ＡＡ７５４及びＡＡ７６８～ＡＡ７８０は、１型遺伝子型内によく保存されている。本発明者らのＥＳ４ ＥＬＩＳＡデータは、タンパク質配列分析と一致し、ＥＳ４エピトープが、１型ＰＲＲＳＶの４つの代表的な野外株に感染した動物に由来する血清試料と反応することができることを示した。しかしながら、ＥＳ４エピトープは、２型分離株に感染した動物に由来する血清試料とは反応しない。ｎｓｐ２領域で同定されたＢ細胞エピトープを比較すると、ｎｓｐ２領域で同定されたエピトープはいずれも、１型及び２型分離株間で保存されなかった。従って、ＥＳ４エピトープ欠損変異株で予防接種されたブタと、２型野外株に感染したブタとを区別するためには、別の診断アッセイが必要である。

【００７９】

ｎｓｐ２領域のＥＳ４エピトープは、ＰＲＲＳＶ複製に必須ではないと考えられるが、ウイルス弱毒化及び病原性にｉｎ ｖｉｖｏで重要な役割を果たしている可能性がある。しかしながら、ＧＦＰの下流にあるＥＳ４エピトープが欠失し、ウイルス力価が、親ウイルスの力価と比較して少なくとも２ｌｏｇだけ低減した場合、ＧＦＰ挿入だけでは、ウイルスのｉｎ ｖｉｔｒｏ増殖特性を実質的に低減しなかった。プラーク形態は、マーカーがウイルス増殖に負の効果を与えることも実証した。ｉｎ ｖｉｖｏ特徴付けにより、ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルスは、野生型ウイルスより低いレベルのウイルス血症及び高いレベルの中和抗体応答で弱毒化されたことが更に実証された。タンパク質配列分析は

、ＥＳ４エピトープ領域が、ｎｓｐ２で最も高い親水性値を有することを示した（Ｈｏｐｐ　＆　Ｗｏｏｄｓ，１９８１）。

【００８０】

意外にも、ＥＳ４エピトープ欠失は、ｎｓｐ２におけるＧＦＰ挿入の安定性を向上させた。別の興味深い知見は、ＧＦＰ遺伝子は完全なままだったにもかかわらず、ＧＦＰ蛍光がｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏで失われたことである。配列分析により、Ａｒｇ－９７からＣｙｓへの突然変異がＧＦＰで同定された。Ａｒｇ－９７からＣｙｓへの突然変異は、２型ウイルスのｎｓｐ２領域に挿入されたＧＦＰに同定されたアミノ酸突然変異とまさに同一である（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００７によって示されているように、そのＡｒｇ－９７はＧＦＰの発色団形成に重要な役割を果たし、発色団形成がｎｓｐ２の機能に影響を与える可能性を示唆する。更に、Ｃｙｓは、通常、タンパク質のジスルフィド結合の形成に関与するアミノ酸であるため、ｎｓｐ２が機能するための正しい立体配座を維持するのに、追加的なジスルフィド結合が必要とされている可能性がある。それでもやはり、ＧＦＰは、ｉｎ　ｖｉｖｏでその免疫原性を保持しており、予防接種を受けた動物と、野生型ウイルスに感染した動物とを区別するための優れた陽性マーカーとして機能する。

【００８１】

この明細書中の出版物及び特許出願は全て、本発明が関する当業者レベルを示す。出版物及び特許出願は全て、あたかも個々の出版物又は特許出願が参照により具体的に及びに個々に示されるのと同程度に、参照により本明細書中に組み込まれる。

【００８２】

本発明は、種々の実施形態及び技術に関して記述されている。しかしながら、本発明の趣旨及び範囲内にありながらも、多数の変更及び改変がなされ得ることは理解されるべきである。

【００８３】

表７　ＧＦＰ／ΔＥＳ４マーカーウイルス全長配列（配列番号４３）

【表７】

atgatgtgta gggtatcccc cctacataca caacactttt tgtgtttgtg tactttggag	60
gcgtgggtac agccccgccc cacccttgg cccctgttct agcccaacag gtatccttct	120
ccctcggggc gagtgcgccg cctgctgctc ccttgcagtg ggaaggacct cccgagtatt	180
tccggagagc acctgcttta cgggatctcc acccttaac catgtctggg acgttctccc	240
ggtgcatgtg caccccggct gcccgggtat tttggaacgc cggccaagtc ttttgcacac	300
ggtgtctcag tgcgcggcct cttctctctc cggaacttca ggacactgac ctcggtgtag	360
ttggattgtt ttacaagcct aaggacaaga ttcactggaa agttcctatc ggcattcctc	420
aggtggagtg tactccatcc gggtgctgct ggctctcagc cgtattccct ttggcgcgca	480
tgacttccgg taatcacaac ttcctccaac gacttgttaa ggttgctgat gttttgtatc	540
gcgatggttg cttggcgcct cgacacctcc gtgaactcca agtttacgag cgcggttgta	600
gctggtaccc aattacgggg cccgtacccg gaatgggttt gtttgcgaac tccatgcacg	660
tgtctgacca gccgttccct ggtgccaccc atgtgttgac taactcgcct ctgcctcagc	720
gggcgtgccg gcagccgttc tgtccatttg aggaagctca ttctgacgtt tacaggtgga	780
agaaatttgt gatttttacg gactcctctc ccaacggtcg atttcgcatg atgtggacgc	840
cggaatccga tgactcagcc gccctggagg tgctgccgcc cgagttagaa cgtcaggtcg	900
agatcctcac tcggagtttt cccgctcatc accctatcaa cctagctgac tgggagctca	960
ctgagtcccc tgagaacggt ttttctttcg gcacgtccca ttcttgcggc cacatcgtcc	1020
agaaccccaa cgtgtttgac ggcaagtgct ggctcacctg ctttttgggc caatcggctg	1080
aagtgtgcta ccacgaggaa catctagcta acgccctcgg ttaccaaacc aagtggggcg	1140
tgcatggtaa gtacctccaa cgcaggcttc aagtccgcgg catgcgtgct gtggtcgatc	1200
ctgacggccc tattcacgtt gaagcgctgt cttgctccca gtcttgggtc aggcacctga	1260
ctctgaataa tgatgtcacc ccaggattcg ttcgcctgac atccatccgc attgtgtcca	1320
acacagaacc caccgctttc cggatctttc ggtttggagc acataagtgg tatggcgctg	1380
ccggcaaacg ggctcgtgcc aaacgtgcca ccaaaagtgg gaaggattcg gccctcgctc	1440
ccaagattgc cccaccggtc cccacctgtg gaatcaccac ctactctcca ccgacagacg	1500
ggtcttgtgg ttggcacgtt cttgccgcca tagtgaatcg gatgataaac ggtgacttta	1560
cgtcccccct gcctcagtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg	1620
ctcaggcgat tcaatgttta caactgcctg ccaccgtggt tcggaatcgc gcctgtccta	1680
acgccaagta cctcataaag ctaaacgggg ttcactggga agtagaggtg agatctggaa	1740
tggctcctcg ttccctttct cgtgaatgtg tagttggcgt ttgctctgaa ggctgtgtcg	1800
caccgcctta tccagcggac gggcttccta aacgtgcact cgaggccttg gcgtctgcct	1860
acagactacc ctcagattgt gttagctctg gtattgctga ctttcttgct gatccacctc	1920
ctcaggaatt ctggactctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccggag cggtccggct	1980
tctccagctt gtataaatta ctcttagagg ttgttccgca aaaatgtggt gctacggaag	2040
gggctttcgt ctatgctgtt gagaggatgt taaaggactg tccgagcccc gaacaggcca	2100
tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tccttggacg	2160
agtgttttcc tgcgggtgtt ccagccgact tcgagccagc atttcaggaa aggccccaaa	2220
gtcccggtgc tgctgtcgcc ctgtgttcac cggacgcaaa agggttcgag ggaacagcct	2280
cggaagaagc tcaagagagt ggccataagg ccgtccacgc tgtacccctt gccgaaggtc	2340
ccaataatga acaggtacag gtggttgctg gtgagcagct agagctcggc ggttgtggtt	2400
tggcaatcgg gagtgctcag atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc	2460
ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg	2520
gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc	2580
tgcccgtgcc ctggcccacc ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc	2640
gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg	2700
tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga	2760
agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg	2820
acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca	2880
tggccgacaa gcagaagaac ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg	2940
acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg	3000
tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg	3060
agaagcgcga tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca	3120
tggacgagct gtacaagtcc tctacagggc ccatactccg tcatgttgag cactgcggca	3180
cagagtcagg cgacagcagt tcgcctttgg atctgtcttt tgcgcaaacg ttggaccagc	3240

表7は次頁につづく

```
ctttagatct atccttggcc gcttggccgg tgaaggccac cgcgtctgat cctggctggg  3300
tccgcggtag gtgcgagcct gtctttttaa agcctcggaa agctttctct gatggcgatt  3360
cggcccttca gttcggggag ctttctgagt ccagctctgt catcgagttt gaccagacaa  3420
aagatactct ggtggctgac gcccctgttg acttgacgac ttcgaacgag gccctctctg  3480
cagtcgaccc ttccgaattt gtcgaactca ggcgcccgcg tcattccgca caagccttaa  3540
ttgaccgagg cggtccactt gctgatgtcc atgcgaaaat aaagaaccgg gtgtatgaac  3600
agtgcctcca agcttgtgag cctggtagtc gtgcaacccc agccaccagg gagtggctcg  3660
acaaaatgtg ggatagggtg gacatgaaaa cttggcgctg cacttcacag ttccaggccg  3720
gtcgcattct tgcgtccctc aaatttcttc ctgacatgat tcaagacacg ccgcctcctg  3780
tccccaagaa gaaccgagct agtgacagtg ccggtcagac cgtccctccg cctacggata  3840
tccagcaaga ggatgccacc ccctccgacg ggttatccca tgcatcggat ttttctagtc  3900
gagtgagcac gagctggagt tggaaaggcc ttatgctttc cggcacccgt ctcgcggggt  3960
ctgctggtca gcgcctcatg acatgggttt ttgaagttta ctcccatctc ccagctttta  4020
tactcacact tttctcgccg cggggctcta tggctccagg cgattggttg tttgcaggtg  4080
ttgttttact tgctctcttg ctctgtcgtt cttacccaat actcggatgc cttcccttac  4140
tgggtgtctt ctctggttct ttgcggcgtg ttcgtctggg tgtttttggt tcttggatgg  4200
cttttgctgt atttttattc tcgactccat ccaacccagt cggttcttct tgtgaccacg  4260
attcgccgga atgtcatgct gagcttttgg ctcttgagca gcgccaactt tgggaacctg  4320
tgcgcggcct tgtggttggc ccctcaggtc tcttatgtgt catccttggc aagttactcg  4380
gtgggtcacg tcatctctgg catgttatcc tacgtttatg catgcttaca gatttggccc  4440
tttctcttgt ttatgtggtg tcccaagggc gttgtcacaa gtgttgggga aagtgtataa  4500
ggacagctcc tgctgaggtg gctctcaatg tatttccttt ctcgcgcgcc actcgcaact  4560
ctctcacatc cttgtgtgat cggttccaaa ctcctaaagg agttgatccc gtgcacttgg  4620
caacgggttg gcgcgggtgt tggcgtggtg agagtcccat ccatcaacca caccaaaagc  4680
ccatagctta tgccaatttg gatgaaaaga aaatatctgc tcaaacggtg gttgctgtcc  4740
catacgaccc cagtcaggct atcaaatgtc tgaaggttct gcaggcggga ggggctatcg  4800
tggaccagcc tacgcctgaa gttgttcgtg tgtctgaaat ccccttttca gccccatttt  4860
tcccaaaagt tccagtcaac ccagattgca ggattgtggt ggattcagat acttttgtgg  4920
ctgcagtccg ctgcggttac tcgacagcac aactggtcct aggccggggc aactttgcca  4980
agttgaatca gacccccctt agggactctg cctccaccaa aacgactggt ggggcctctt  5040
atactcttgc tgtggctcaa gtgtctgtgt ggactcttgt tcatttcatc ctcggtcttt  5100
ggttcacatc acctcaagtg tgtggccgag gaaccgctga cccatggtgt tcaaatccct  5160
tttcgtatcc tgcctacggc cctggagttg tgtgctcctc tcgactttgt gtgtctgccg  5220
atggggtcac cctgccattg ttctcagctg tggcacaact ctccggtaga gaggtaggga  5280
tttttatttt agtgcttgtt tccttgactg ccttggccca tcgcctggct cttaaggcag  5340
acatgttagt ggtcttttca gctttttgtg cttacgcctg gcccatgagc tcctggttaa  5400
tctgcttctt tcctatactc ttaaagtggg ttacccttca ccccctcact atgctttggg  5460
tgcactcatt cttggtgttt tgtatgccag cagccggcat cctctcacta gggataactg  5520
gccttctctg ggcagttggc cgctttaccc aggttgccgg aattattaca ccttatgaca  5580
tccaccagta tacctctggg ccacgcggtg cagccgctgt agccacagcc ccagaaggca  5640
cttatatggc cgccgtccgg agagctgctt taactggacg aactttgatc ttcaccccgt  5700
ctgcggtcgg atcccttctt gaaggtgctt tcaggactca taaaccctgc cttaacaccg  5760
tgaatgttgt gggttcttcc cttggttctg gaggggtttt taccattgat ggcagaaaga  5820
ccgtcgtcac tgctgctcat gtgttgaacg gcgacacagc tagagttacc ggcgactctt  5880
acaaccgcat gcacactttt aagaccagtg gcgattatgc ctggtcccat gctgatgact  5940
ggcagggcgt tgcccctgtg gtcaaggttg cgaaggggta tcgcggtcgt gcctactggc  6000
aaacatcaac cggtgtcgaa cccggcgtca ttggggaagg gttcgccttc tgtttcacca  6060
actgtggcga ttcggggtca cccgtcatct cagaatctgg tgatctcatc ggaatccata  6120
ccggttcaaa caaactcggt tctggtcttg tgacgacccc tgaaggggaa acctgcgcca  6180
tcaaagaaac caagctctct gacctttcca gacattttgc gggcccgagc gtccctcttg  6240
gggacattaa attgagtccg gccatcgtcc ctgatgtaac atctattccg agtgacttgg  6300
catcgctcct agcttccgtc cctgtaatgg aaggcggcct ctcgaccgtt caacttctgt  6360
gtgtcttttt ccttctctgg cgcatgatgg gccatgcctg gacacccatt gttgccgtgg  6420
gcttcttttt gctgaatgaa attcttccag cagttttggt ccgagccgtg ttttcctttg  6480
cactctttat tcttgcatgg gccacccccc ggtccgcaca ggtgttaatg attagactcc  6540
```

表7は次頁につづく

```
tcacggcatc cctcaaccgc aacaagttgt ctctggcgtt ctacgcactt gggggtgtcg  6600
tcggtttggc cgctgaaatc ggggcttttg ccggcaggct gcctgaattg tctcaagctc  6660
tttcgacata ctgtttctta cctagggtcc ttgccatggc cagttatgtt cccatcatca  6720
tcattggtgg actccatgcc ctcggtgtga ttctgtggtt gttcaaatac cggtgcctcc  6780
acaacatgct ggttggtgat gggagtttct caagcgcttt cttcctacgg tattttgcag  6840
agggtaatct tagaaaaggt gtttcacagt cttgtggcat gagtaacgag tccctgacgg  6900
ctgctctagc ttgcaagttg tcgcaggctg accttgactt tttgtccagc ttaacgaact  6960
tcaagtgctt tgtatctgct tcaaacatga aaaatgctgc cggccagtat attgaagcag  7020
cgtatgccaa ggccctgcgc caagagttgg cctccctagt tcaggttgac aaaatgaaag  7080
gaattttgtc taagcttgag gcctttgctg aaacagccac tccgtccctt gacgcaggtg  7140
acgtggttgt tctgcttggg caacatcctc acggatccat cctcgatatt aatgtgggga  7200
ctgaaaggaa aactgtgtcc gtgcaagaga cccggagctt aggtggttcc aaattcagtg  7260
tttgcactgt cgtgtccaac acacccgtgg acgccttaac tggcatccca ctccagacac  7320
caacccctct ttttgagaat ggtccgcgtc accgtggtga ggaagacgat cttagagtcg  7380
agaggatgaa gaaacactgt gtgtccctcg gcttccacaa cattaatggc aaagtttact  7440
gcaaaatttg ggacaagtcc accggtgata ccttttatac cgatgattcc cggtacaccc  7500
aagaccttgc attccaggac aggtcagccg actacagaga cagggattat gagggtgtgc  7560
aaaccgcccc ccaacagggc tttgatccaa agtctgaaac ccctattggc actgtggtga  7620
tcggcggtat cacgtataac aggtacctga tcaaaggtaa ggaggtcttg gttcccaagc  7680
ctgacaactg ccttgaagct gccaagctgt cccttgagca agctctcgct gggatgggcc  7740
aaacttgcga ccttacagct gccgaggtgg aaaagttgag gcgcatcatt agccagctcc  7800
aaggtttgac cactgaacag gctttaaact gttagccgcc agcggcttga cccgctgtgg  7860
ccgcggcggc ttagttgtaa ctgaaacagc ggtaaaaatc gtaaagtacc acagcagaac  7920
tttcacccta ggccctctgg acctgaaagt cacctccgag gctgaggtaa agaaatcaac  7980
tgagcagggc cacgctgttg tggcaaactt atgttctggt gtcatcttga tgagacctca  8040
cccaccgtcc cttgttgatg ttcttctgaa acccggactt gacacaaaac ccggcattca  8100
accagggcat ggggccggga atatgggcgt agacggctct acttgggatt ttgaaaccgc  8160
acccacaaag gcagaacttg agttgtccaa acaaataatt caagcatgtg aagttaggcg  8220
cggggacgcc ccgaacctcc aactccctta caagctctat cctgttagag gggatcctga  8280
gcggcatggg ggccgcctta tcaataccag gtttggagat ctatcttaca aaacccctca  8340
agacaccaag tccgcaatcc atgcggcttg ttgcctgcac cccaacgggg cccctgtgtc  8400
tgatggtaag tcaacactag gtaccaccct tcaacatggt ttcgaacttt atgtccccac  8460
tgtgccctat agtgtcatgg agtacctcga ttcacgccct gacacccctt tcatgtgcac  8520
taaacatggt acttccaagg ctgctgcaga agacctccaa aaatacgacc tatctactca  8580
aggatttgtc ctgcccgggg tcttacgcct tgtacgcaga ttcatctttg gccatattgg  8640
taaggcaccg ccattgttcc tcccgtcaac ctatcccgct aaaaattcta tggcagggat  8700
caatggccag aggttcccaa caaaggacgt ccagagcata cctgaaattg acgaaatgtg  8760
tgcccgcgcc gtcaaggaga attggcaaac tgtgacacct tgtaccctca agaaacagta  8820
ctgttccaag cccaaaacca ggaccatcct gggcaccaac aactttattg ccctggctca  8880
ccgatcggcg ctcagtggtg tcacccaggc attcatgaag aaggcttgga agtccccgat  8940
tgccttggga aaaaacaaat tcaaggagct gcattgcact gtcgccggca ggtgtcttga  9000
agccgacttg gcctcctgtg accgcagcac ccccgccatt gtgaggtggt tcgtcgccaa  9060
cctcctgtat gaacttgcag gatgtgaaga gtacttgcct agctatgtgc ttaactgctg  9120
ccatgacctt gtggcaacac aggatggtgc cttcacaaaa cgcggtggcc tgtcgtccgg  9180
ggaccccgtc accagtgtgt ctaacaccgt atattcactg ataatctatg cccagcacat  9240
ggtgttgtcg gccttaaaaa tgggtcatga aatcggtctc aagttcctcg aggaacagct  9300
caaattcgag gacctcctcg aaatccagcc tatgttggtc tattctgatg accttgtctt  9360
gtacgctgaa aggcccactt ttcctaatta tcactggtgg gtcgagcacc ttgacctaat  9420
gctgggtttc agaacggacc caaagaagac agtcataact gataaaccca gcttcctcgg  9480
ctgcagaatt gaggcggggc gacagctggt ccctaatcgc gaccgcatcc tggctgctct  9540
cgcatatcac atgaaggcgc agaacgcctc agagtattat gcgtctgctg ccgcaatcct  9600
gatggattca tgtgcttgca ttgatcatga ccctgagtgg tatgaggacc tcatctgcgg  9660
tatcgcccga tgcgcccgcc aggatggtta tagtttccca ggcccggcat ttttcatgtc  9720
catgtgggaa aagctgagaa gtcacaatga agggaagaaa tttcgacact gcggcatctg  9780
cgacgccaaa gccgaccatg catccgcctg tgggcttgat ttgtgtttgt tccactcaca  9840
```

表7は次頁につづく

```
ctttcatcaa cactgccccg tcactctgag ctgtggtcat catgccggtt caagggaatg  9900
ttcgcagtgt cagtcacctg ttggggctgg cagatctcct cttgatgccg tgctaaaaca  9960
aatcctgtac aaacctcctc gtacagtcat catgaaggtg ggtaacaaaa caacggccct 10020
cgatccgggg aggtaccagt cccgtcgagg tcttgttgca gtcaagaggg gtattgcagg 10080
caatgaagtt gatcttcctg atggggacta ccaagtagtg cctcttttac caacttgtaa 10140
agacataaac atggtaaagg tggcttgcaa tgtactactc agtaagttca tagtggggcc 10200
accaggttcc ggaaagacca cctggttact gagtcaagtc caggacgatg atgtcattta 10260
cacacccacc catcagacca tgtttgatat agtcagtgct ctcaaagttt gcaggtattc 10320
tattccagga gcctcaggac ttcctttccc accacctgcc aggtccgggc cgtgggttag 10380
gctcgtggcc agcgggcacg tccccggccg aacatcatac ctcgatgagg ctggatattg 10440
taatcatctg gacattctca gactgctttc caaaacaccc ctcgtgtgtt tgggtgacct 10500
tcaacaactt caccctgtcg gctttgactc ctactgttat gtgtttgatc agatgcctca 10560
aaagcaactg accactattt atagatttgg ccctaacatc tgcgcagcca tccagccttg 10620
ttacagggag aagcttgaat ctaaggctag gaacaccagg gtggtcttta ccacctggcc 10680
tgtggccttt ggtcaggtgc tgacaccata ccataaagat cgcatcggct ctgcgataac 10740
catagactca tcccaggggg ccactttcga cattgtgaca ttgcatctac catcaccaaa 10800
gtccctaaat aaatcccgag cacttgtagc catcactcgg gcaagacacg ggttgttcat 10860
ttatgaccct cacaaccagc tccaggagtt tttcaacctg atccctgagc gcactgattg 10920
caaccttgtg ttcagccgtg gggatgatct ggtagttctt agtgcggaca atgcagtcac 10980
aactgtagcg aaggccctag ggacaggtcc atctcgattt cgagtatcag acccgaggtg 11040
caagtctctc ttagctgctt gttcggccag tctggagggg agctgtatgc cactaccaca 11100
agtggcacat aacctggggt tttacttctc cccagacagt ccagcatttg cacctctgcc 11160
aaaggagtta gcgccacatt ggccagtggt tactcaccag aacaatcggg cgtggcccga 11220
tcgacttgtc gctagtatgc gcccaattga tgcccgctac agcaagccaa tggtcggtgc 11280
agggtatgtg gtcgggccgt ccacctttct tggtactcct ggtgtagtgt catactacct 11340
cacgctatac atcaggggtg agccccaggc cttgccagag acactcgttt caacaggacg 11400
catagccact gactgccggg agtatctcga cgcggctgag gaagaggcag caaaagaact 11460
cccccacgca ttcattggcg atgtcaaagg taccacggtc ggggggtgtc accacatcac 11520
atcaaaatac ctacccagga ccctgcctaa ggactctgtt gctgtagttg gagtaagctc 11580
gcccggcagg gctgctaaag ccatgtgcac tctcactgat gtgtatctcc ccgaactccg 11640
gccatacctg caacctgaga cggcgtcgaa atgctggaaa ctcaaattag acttcaggga 11700
cgtccgacta atggtctgga aaggagccac cgcctatttc cagttggaag gacttacatg 11760
gtcagcgctg cctgactatg ccaggtttat tcagcttccc aaggacgccg ttgtgtacat 11820
tgatccgtgt ataggaccgg caacagccaa ccgcaaggtc gtgcgaacca cagactggcg 11880
ggccgacctg gcagtgacac cgtatgatta cggtgcccag aacattttga caacagcctg 11940
gttcgaggac ctcgggccgc agtggaagat tttggggttg cagcccttca ggcgggcatt 12000
tggctttgaa aatactgagg attgggcaat ccttgcacgc cgtatgagtg acggcaaaga 12060
ctacactgac tacaactggg attgtgttcg agaacgccca cacgccatct acgggcgtgc 12120
tcgtgaccat acatatcatt ttgcccccgg cacggaattg caggtagagc tgggtaaacc 12180
ccggctgccg cctggacgag agccgtaaac ttggagtgat gcaatggggt cactgtggag 12240
taaaatcagc cagctgttcg tggatgcctt cactgagttt cttgtcagtg tggttgatat 12300
tgtcattttc cttgccatac tgtttgggtt caccgtcgca ggatggttat tggtctttct 12360
tctcagagtg gtttgctccg cgcttctccg ttcgcgctct gccattcact ctcccgaact 12420
atcgaaggtc ctatgaaagc ttgttgccca actgcaggcc ggatgtccca caatttgcat 12480
ttaagcaccc attgggtata ctttggcaca tgcgagtttc ccacctgatt gatgagatgg 12540
tctctcgccg catttaccag accatggaac attcaggtca agcggcctgg aaatatgtgg 12600
tcggtgaggc cactctcacg aagctatcaa agcttgatat agttactcat ttccaacatc 12660
tggccgcagt agaggcggat tcttgccgct ttctcagctc acgactcgtg atgctaaaaa 12720
atcttgccgt tggcaatgtg agcctacagt acaacaccac gttggatcgc gttgaactca 12780
ttttccccac gccaggtacg aggcccaagt tgaccgactt cagacaatgg ctcatcagtg 12840
tgcatgcttc catttttcc tctgtggctt catctgttac cttgttcata gtgctttggc 12900
tgcgaattcc agctctacgc tatgtttttg gtttccattg gcccacggca acacatcatt 12960
cgagctgacc atcaattata ccatatgcat gccctgtctt accagtcaag cagctcgcca 13020
aaggctcgag cccggtcgta acatgtggtg cagaataggg catgataggt gtgaggagcg 13080
tgaccatgat gagttgttaa tgtccatccc gtccgggtac gacaacctca aacttgaggg 13140
```

表7は次頁につづく

```
atattatgct tggctggctt ttttgtcctt ttcctacgcg gcccaattcc atccggagct 13200
gttcgggata gggaatgtgt cgcgcgtctt cgtggacaag cgacaccagt ttatttgtgc 13260
cgagcatggt ggactcaatt caaccttatc taccgagcac aatatctccg cattatatgc 13320
ggtatattat caccaccaaa tagacggggg taattggttc catttggaat ggctgcggcc 13380
gctttttcc tcctggttgg tgctcaacat atcatggttt ctgaggcgtt cgcctgtaag 13440
ccctgtttct cgacgcatct atcagatatt aagaccaaca cgaccgcggc tgccggtttc 13500
atggtccttc agaacatcaa ttgttcccgg cctcacgagg cctcagcaac gcaaggtcaa 13560
gttccctcca gaaagtcgtc ccaatgccgt gaagccgtcg gtgttcccca atacatcacg 13620
ataacggcca acgtgaccga cgaatcatat ttgtacaacg cggacttgct gatgctttct 13680
gcgtgccttt tctacgcctc ggaaatgagc gagaaaggct ttaaagttat ctttgggaat 13740
gtctctggcg ttgtttctgc ttgtgtcaat ttcacagatt atgtggccca tgtgacccaa 13800
catacccagc agcatcatct ggtgattaat cacatccggt tactgcactt cctgacacca 13860
tctgcaatga ggtgggctac aaccattgct tgtctgttcg ccattctctt ggcgatatga 13920
aatgttctca caaattgggg cattccttga ctccgcactc ttgcttctgg tggctttttt 13980
tgctgtgtac cggcttgtcc tggtcctttg ccgatggcaa cggcaacaac tcgacatacc 14040
aatacatata taatttgacg atatgcgagt tgaatgggac caattggctg tccggccatt 14100
ttgaatgggc agttgagacc tttgtgcttt acccggttgt cactcatatc ctctcactgg 14160
gttttctcac gacaagtcat ttttttgacg cgctcggtct cggcgctgta tccactgcag 14220
gatttgtcgg agggcggtat gtacttagca gcgtctacgg cgcttgtgct ttcgcagcgt 14280
tcgtatgctt cgtcatccgt gctgctaaaa attgcatggc ctgccgctat gcccgtaccc 14340
ggttcaccaa cttcattgtg gacgaccggg ggggagttca tagatggaag tctccaatag 14400
tggtagaaaa actgggcaaa gccgaaattg gcggcaacct tgtcaccatc aaacatgtcg 14460
tcctcgaagg ggttaaagct caacccttga cgagaacttc ggccgagcaa tgggaggcct 14520
agataatttt tgcaacgatc ctaccgccgc acaaaagatc gtgctagcct tcagcatcac 14580
atacacacct ataatgatat acgcccttaa ggtgtcacgc ggccgactcc tggggctgtt 14640
gcacatccta atatttctga actgttcctt tacattcgga tacatgacat atgtgcattt 14700
tcattctacc caccgtgtcg cacttaccct gggggctgtt gtcgcccttt tgtggggtgt 14760
ctacagcctc acagagtcat ggaagtttat cacttccaga tgcagattgt gttgcctcgg 14820
ccggcgatac attctggccc ctgcccatca cgtagaaagt gctgcaggtc tccattcaat 14880
ctcagcgtct ggtaaccgag catacgctgt gagaaagccc ggactaacat cagtgaacgg 14940
cactctagta ccaggacttc ggagcctcgt gctgggcggc aaacgagctg ttaaacgagg 15000
agtggttaac ctcgtcaagt atggccggta aaaatcagag ccagaagaaa aagaaaagta 15060
cggctccaat ggggaatggc cagccagtca atcaactgtg ccagttgctg ggtgcaatga 15120
taaagtccca gcgccagcaa cctaggggag gacaggctaa aaagaaaaag cctgagaagc 15180
cacattttcc cctggctgca gaagatgaca tccggcacca cctcacccaa actgaacgct 15240
ccctctgctt gcaatcgatc cagacggctt tcaatcaagg cgcaggaact gcgtcgcttt 15300
catccagcgg gaaggtcagt ttccaggttg agtttatgct gccggttgct catacagtgc 15360
gcctgattcg cgtgacttct acatccgcca gtcagggtgc aaattaattt gacagtcagg 15420
tgaatggccg cgattggcgt gtggcctctg agtcacctat tcaattaggg cgatcacatg 15480
ggggtcatac ttaatcaggc aggaaccatg tgaccgaaat t                    15521
```

【００８４】

参考文献

1. Allende, R., Lewis, T. L., Lu, Z., Rock, D. L., Kutish, G. F., Ali, A., Doster, A. R. & Osorio, F. A. (1999). North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. J Gen Virol 80, 307-315.

2 Babiuk, L., Lewis, J., Suradhat, S., Baca-Estrada, M., Foldvari, M. & Babiuk, S. (1999). Polynucleotide vaccines: potential for inducing immunity in animals. J Biotechnol 73, 131-140.

3. Babiuk, L. A. (1999). Broadening the approaches to developing more effective vaccines. Vaccine 17, 1587-1595.

4. Babiuk, L. A., Babiuk, S. L. & Baca-Estrada, M. E. (2002). Novel vaccine strategies. Adv Virus Res 58, 29-80.

5. Barrett, T., Parida, S., Mohapatra, M., Walsh, P., Das, S. & Baron, M. D. (20

03). Development of new generation rinderpest vaccines. Dev Biol 114, 89-97.
6. Bautista, E. M., S. M. Goyal, I. J. Soon, H. S. Joo, and J. E. Collins. 1996. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch. Virol. 141:1357-1365.
7. Benfield, D. A., E. Nelson, J. E. Collins, L. Harris, S. M. Goyal, D. Robison, W. T. Christianson, R. B. Morrison, D. Gorcyca, and D. Chladek. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J. Vet. Diagn. Invest. 4:127-133.
8. Bosch, J. C, Kaashoek, M. J., Kroese, A. H. & Van Oirschot, J. T. (1996). An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. Vet Microbiol 52, 223-234.
9. Calvert, J. G., M. G. Sheppard, and S. K. W. Welch. 2003. Infectious cDNA clone of North American porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and use thereof. 米国特許出願第20030157689号。
10. Calvert, J. G., M. G. Sheppard, and S. K. W. Welch. 2002. Infectious cDNA clone of North American porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and use thereof. 米国特許第6,500,662号。
11. Castillo-Olivares, J., Wieringa, R. T., Bakonyi, A. A. F., de Vries, N. J., Poyner, D. & Rottier, P. J. M. (2003). Generation of a candidate live marker vaccine for equine arteritis virus by deletion of the major virus neutralization domain. J Virol 77, 8470-8480.
12. Collins, J. E., D. A. Benfield, W. T. Christianson, L. Harris, J. C. Hennings, D. P. Shaw, S. M. Goyal, D. Gorcyca, D. Chladek, S. McCullough, R. B. Morrison, and H. S. Joo. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (Isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J. Vet. Diag. Invest. 4:117-126.
13. den Boon, J. A., K. S. Faaberg, J. J

. M. Meulenberg, A. L. M. Wassenaar, P. G. W. Plagemann, A. E. Gorbelenya, and E. J. Snijder. 1995. Processing and evolution of the N-Terminal region of the arterivirus replicase ORFIa protein: identification of two papainlike cysteine proteases. J. Virol. 69:4500-4505.
14. de Lima, M., Pattnaik, A. K., Flores, E. F. & Osorio, F. A. (2006). Mapping of B- cell linear epitopes on Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology 353, 410-421.
15. Fang, Y., D. -Y. Kim, S. Ropp, P. Steen, J. Christopher-Hennings, E. A. Nelson, and R. R. R. Rowland. 2004. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. Virus Res. 100:229-235.
16. Fang, Y., Rowland, R. R. R., Roof, M., Lunney, J. K., Christopher-Hennings, J. & Nelson, E. A. (2006). A full-length cDNA infectious clone of North American type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: expression of green fluorescent protein in the nsp2 region. J Virol 80, 11447-11455.
17. Fang, Y., Schneider, P., Zhang, W. P., Faaberg, K., Nelson, E. A. & Rowland, R. R. R. (2007). Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus. A rch Virol 152, 1009-1017.
18. Ferrin, N. H., Fang, Y., Johnson, C. R., Murtaugh, M. P., Poison, D. D., Torremorell, M., et al. (2004). Validation of a Blocking ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. CHn Diagn Lab Imm 11, 503-514.
19. Fitzgerald, D. J., Branson, E. D. & Anderson, J. N. (1996). Compositional similarities between the human immunodeficiency virus and surface antigens of pathogens. AIDS Res Hum Retroviruses 12, 99.
20. Floegel-Niesmann, G. (2003). Marker vaccines and companion diagnostic tests for classical swine fever. Dev Biol 114,

185-191.
21. Frias-Staheli, N., Glannakopoulos, N. V., Klkkert, M., Taylor, S. L., Bridgen, A., Paragas, J., Richt, J. A., Rowland, R. R. R., Schmaljohn, C. S., Lenschow, D. J., Snijder, E. J., Garcia-Sastre, A. & Virgin, H. W. (2007). Ovarian tumor domain- containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. Cell Host Microbe 2, 404-416.
22. Gao, Z. Q., X. Guo, and H. C. Yang. 2004. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. Arch. Virol. 149:1341-1351.
23. Garrity, R. R., Rimmelzwaan, G., Minassian, A., Tsai, W. P., Lin, G., de Jong, J., Goudsmit, J. & Nara, P. (1997). Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. J Immunology 159, 279-289.
24. Hall, B. F. & Joiner, K. A. (1991). Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defenses. Immunol Today 12, A22.
25. Hayashi, N., Welschof, M., Zewe, M., Braunagel, M., Dubel, S., Breitling, F. & Little, M. (1994). Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. Biotechniques 17, 310, 312, 314-315.
26. Halbur, P. G., P. S. Paul, M. L. Frey, J. Landgraf, K. Eernisse, X.-J. Meng, M. A. Lum, J. J. Andrews, and J. A. Rathje. 1995. Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet. Pathol. 32:648-660.
27. Han, J., Liu, G., Wang, Y. & Faaberg, K. S. (2007). Identification of nonessential regions of the nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture. J Virol 81, 9878- 9890.
28. Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Site- directed mutagenesis by overlap exte

nsion using the polymerase chain reaction. Gene. 77:51-59.
29. Hopp, T. P. & Woods, K. R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc Natl Acad Sci 78, 3824-3828.
30. Jespersen, T., D. Mogens, and F. S. Pedersen. 1997. Efficient non-PCR-mediated overlap extension of PCR fragments by exonuclease 'end polishing.' Biotechniques 23:48-52.
31. Johnson, C. R., Yu, W. & Murtaugh, M. (2007). Cross-reactive antibody responses to nspl and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol 88, 1184-1195.
32. Keffaber, K. K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. 1:1-9.
33. Kim, D. Y., Calvert, J. G., Chang, K. O., Horlen, K., Kerrigan, M., Rowland, R. R. R. (2007). Expression and stability of foreign tags inserted into nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Virus Research 128, 106-114.
34. King, N. J. & Kesson, A. M. (2003). Interaction of flaviviruses with cells of the vertebrate host and decoy of the immune response. Immunol Cell Biol 81, 207-216.
35. Konig, P., Beer, M., Makoschey, B., Teifke, J. P., Polster, U., Giesow, K. & Keil, G. M. (2003). Recombinant virus-expressed bovine cytokines do not improve efficacy of a bovine herpesvirus 1 marker vaccine strain. Vaccine 22, 202-212.
36. Mardassi, H., B. Massive, and S. Dea. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virology 221:98-l 12.
37. Marrack, P. & Kappler, J. (1994). Subversion of the immune system by pathogens. Cell 76, 323.
38. Mebatsion, T., Koolen, M. J. M., de Vaan, L. T. C, de Haas, N., Braber, M., Romer-Oberdorfer, A., van den Elzen, P. & van der Marel, P. (2002). Newcastle di

sease virus marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope. J Virol 76, 10138-10146.
39. Meng, X. J., P. S. Paul, I. Morozov, and P. G. Halbur. 1996. A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 77:1265-1270.
40. Meulenberg, J. J., J. N. Bos-de Ruijter, R. Van de Graaf, G. Wensvoort, and M. Moormann. 1998. Infectious transcripts from cloned genomic-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Virol. 72:380-387.
41. Meulenberg, J. J., and A. Petersen-den Besten. 1996. Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particles. Virology 225:44-51.
42. Meulenberg, J. J. M., A. Petersen-den Besten, E. P. de Kluyver, R. J. M. Moormann, W. M. M. Schaaper, and G. Wensvoort. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. Virology 206:155-163.
43. Meulenberg, J. J., M. M. Hulst, E. J. de Meijer, P. L. Moonen, A. den Besten, E. P. de Kluyver, G. Wensvoort, and R. J. Moormann. 1993. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology 192:62-72.
44. Moradpour, D., M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach, and C. M. Rice. 2004. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5 A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. J. Virol. 78:7400-7409.
45. Mounir, S., H. Mardassi, and S. Dea. 1995. Identification and characterization of the porcine reproductive respiratory virus ORFs 7, 5 and 4 products. Adv.

Exp. Med. Biol. 80:317-320.
46. Nara, P. L., Smit, L., Dunlop, N., Natch, W., Merges, M., Waters, D., Kelliher, J., Gallo, R. C, Fischinger, P. J. & Goudsmit, J. (1990). Emergence of viruses resistant to neutralization by V3 -specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1 IIIB infection of chimpanzees. J Virol 64, 3779-3791.
47. Nelson, E. A., J. Christopher-Hennings, T. Drew, G. Wensvoort, J. Collins, and D. A. Benfield. 1993. Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 31 :3184-3189.
48. Nelson, E. A., J. Christopher-Hennings, and D. A. Benfield. 1995. Structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Adv. Exp. Med. Biol. 380:321-323.
49. Nelsen, C. J., Murtaugh, M. P. & Faaberg, K. S. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J Virol 73, 270-280.
50. Neumann, E. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. JAVMA, 227:385-392.
51. Nielsen, H. S., G.-P. Liu, J. Nielsen, M. B. Oleksiewicz, A. Botner, T. Storgaard, and K. S. Faaberg. 2003. Generation of an infectious clone of VR-2332, a highly virulent North American-type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Virol. 77:3702-3711.
52. Oleksiewicz, M. B., A. Botner, P. Toft, P. Normann, and T. Storgaard. 2001. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. J. Virol. 75:3277-3290.
53. Ropp, S. L., C. E. Mahlum Wees, Y. Fang, E. A. Nelson, K. D. Rossow, M. Bien, B. Arndt, S. Preszler, P. Steen, J. Ch

ristopher-Hennings, J. E. Collins, D. A. Benfield, and K. S. Faaberg. 2004. Characterization of emerging European-like PRRSV isolates in the United States. J. Virol. 78:3684-3703.
54. Shen, S., J. Kwang, W. Liu, and D. X. Lui. 2000. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the nsp2 gene with a unique insertion. Arch. Virol. 145:871-883.
55. Snijder, E. J., and J. J. Meulenberg. 1998. The molecular biology of arteriviruses. J. Gen. Virol. 79:961-979.
56. Snijder, E. J., A. L. M. Wassenaar, and W. J. M. Spaan. 1994. Proteolytic processing of the replicase ORFIa protein of equine arteritis virus. J. Virol. 68: 5755-5764.
57. Snijder, E. J., Wassenaar, A. L. M., Spaan, W. J. & Gorbalenya, A. E. (1995). The arterivirus Nsp2 protease. An unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain- like and chymotrypsin-like proteases. J Biol Chem 270, 16671-16676.
58. Sun, T., Lu, P. & Wang, X. (2004). Localization of infection-related epitopes on the non-structural protein 3 ABC of foot-and-mouth disease virus and the application of tandem epitopes. J Virol Methods 119, 79-86.
59. Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C, et al. (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. PLoS ONE 2, 526.
60. Truong H. M., Z. Lu, G. Kutish, J. Galeota, F. A. Osorio, and A. K. Pattnaik. 2004. A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo markers of virulence and transmissibility characteristics of the parental strain. Virology. 325:308-319.
61. van Dinten, L. C, A. L. Wassenaar, A. E. Gorbalenya, W. J. Spaan, and E. J.

Snijder. 1996. Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. J. Virol. 70:6625-6633.
62. van Gennip, H. G., Bouma, A., van Rijn, P. A., Widjojoatmodjo M. N. & Moormann, R. J. (2002). Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV. Vaccine 20, 1544-1556.
63. van Oirschot, J. T. (2001). Present a future of veterinary viral vaccinology: a review. Vet. Quart 23, 100-108.
64. van Oirschot, J. T., Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A. & Stegeman, J. A. (1996). The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. J Biotechnol AA, 75- 81.
65. Vijayakrishanan, L., Kumar, V., Agrewala, J. N., Mishra, G. C. & Rao, K. V. (1994). Antigen-specific early primary humoral responses modulate immunodominance of B cell epitopes. J Immunol. 153, 1613-1625.
66. Walsh, E. P., Baron, M. D., Rennie, L., Anderson, J. & Barrett, T. (2000). Development of a genetically marked recombinant rinderpest vaccine expressing green fluorescent protein. J Gen Virol 81, 709-718.
67. Wasilk, A., J. Callahan, J. Christopher-Hennings, B. T. Gay, Y. Fang, M. Dammen, M. Torremorell, D. Poison, M. Mellencamp, E. A. Nelson and W. Nelson. 2004. Detection of U. S. and Lelystad/European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus and relative quantitation in boar semen and serum by real-time PCR. J. Clin. Micro. 42:4453-4461.
68. Wassenaar, A. L., W. J. Spaan, A. E. Gorbalenya, and E. J. Snijder. 1997. Alternative proteolytic processing of the arterivirus replicase ORF1a polyprotein: evidence that Nsp2 acts as a cofactor for the Nsp4 serine protease. J. Virol. 71:9313-9322.
69. Wensvoort, G., C. Terpstra, J. M. Po

L, E. A. ter Laak, M. Bloemrad, E. P. de Kluyer, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar, J. M. Broekhuijsen, P. L. J. M. Moonen, T. Zetstra, E. A. de Boer, H. J. Tibben, M. F. de Jong, P. van't Veld, G. J. R. Groenland, J. A. van Gennep, M. T. H. Voets, J. H. M. Verheijden, and J. Braamskamp. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Quarterly 13:121-130.

70. Widjojoatmodjo, M. N., van Gennip, H. G., Bouma, A., van Rijn, P. A., Moormann, R. J. (2000). Classical swine fever virus E(rns) deletion mutants: trans-complementation and potential use as non transmissible, modified, live- attenuated marker vaccines. J Virol 74, 2973-2980.

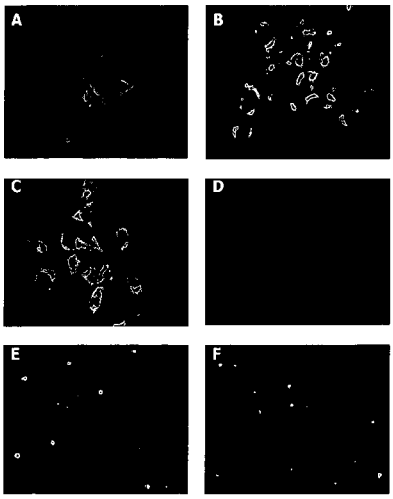
71. Wu, W. H., Fang, Y., Rowland, R. R. R., Lawson, S. R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K. J. & Nelson, E. A. (2005). The 2b protein as a minor structural component of PRRS V. Virus Res 114, 177-181.

72. Wu, W. H., Y. Fang, R. Farwell, M. Steffen-Bien, R. R. Rowland, J. Christopher- Hennings, and E. A. Nelson. 2001. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF 2b. Virology 287:183-191.

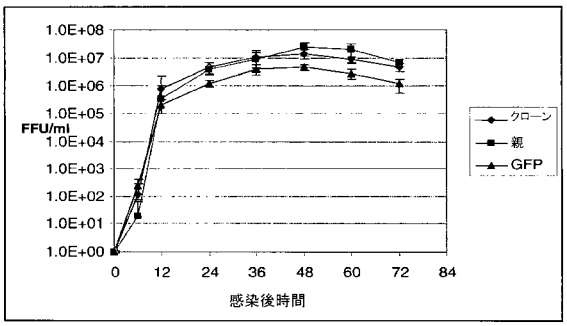
73. Zeman, D., R. Neiger, M. Yaeger, E. Nelson, D. Benfield, P. Leslie-Steen, J. Thomson, D. Miskimins, R. Daly, and M. Minehart. 1993. Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds. J. Vet. Diagn. Invest. 5:522-528.

74. Y. Fang, B. Neiger, T. Hawkins, J. Christopher-Hennings, R. Rowland, E. Nelson, Proc. Conf. Res. Work. Anim. Dis., abstr. 78, 2004

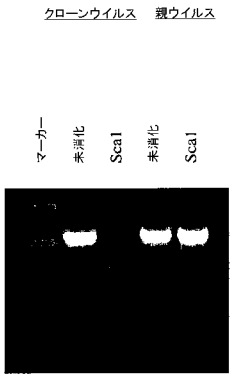
【図２】



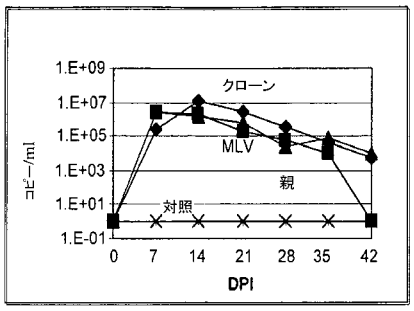
【図３】



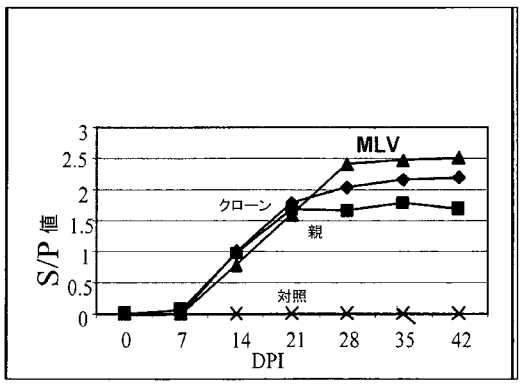
【図４】



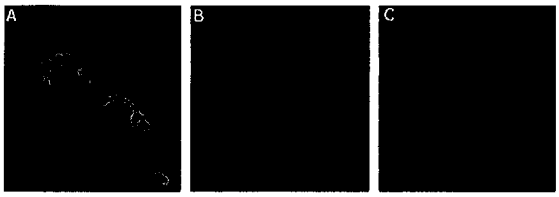
【図５Ａ】



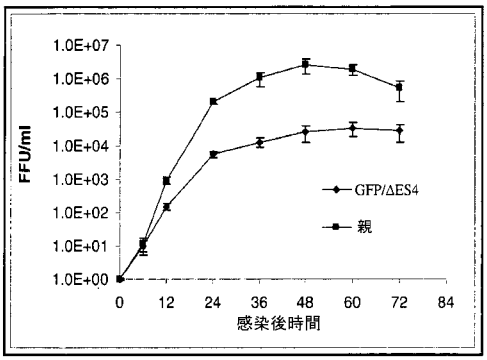
【図５Ｂ】



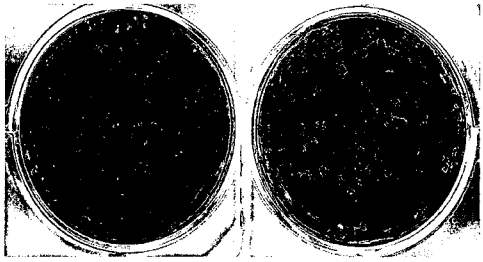
【図６】



【図９】

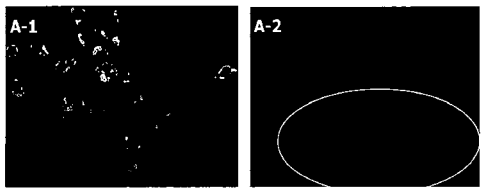


【図１０】



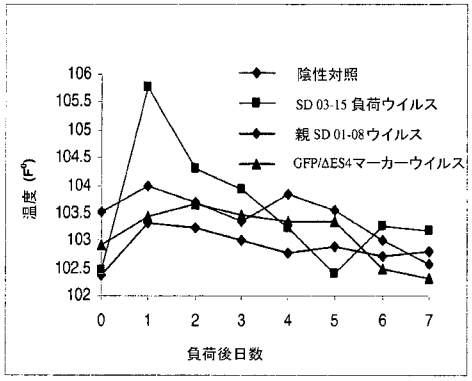
10-1. ΔES4/GFP マーカーウイルス　10-2. 親

【図１１】

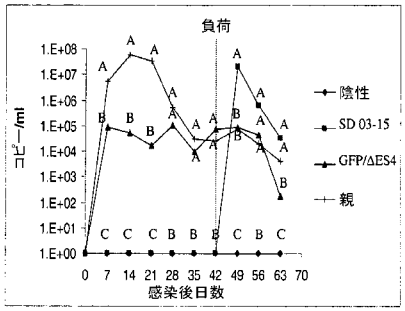


GFP 発現　抗 N mAb 染色

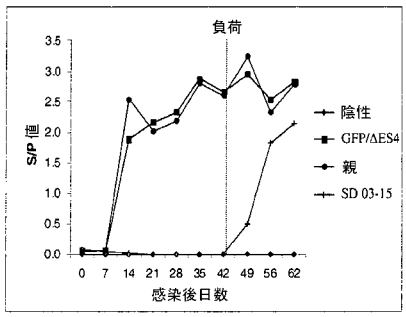
【図１３】



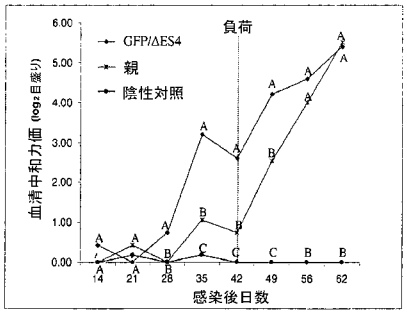
【図１４Ａ】



【図１４Ｂ】



【図１４Ｃ】



【図１５Ａ】

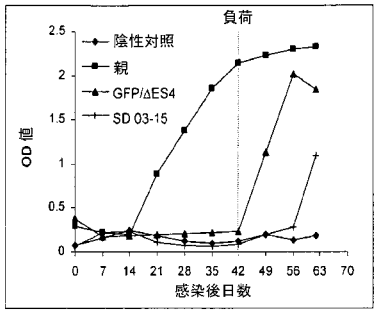


FIG. 15A. ES4 エピトープに基づく ELISA.

【図１５Ｂ】

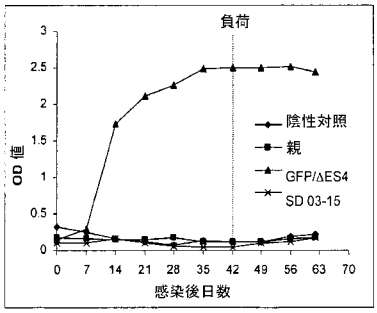


FIG. 15B. GFP 抗原に基づく ELISA.

【図１５Ｃ】

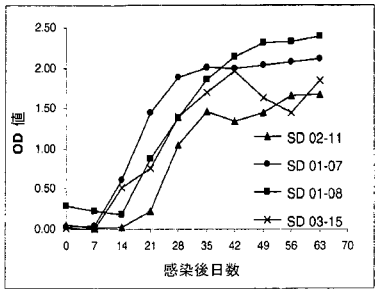
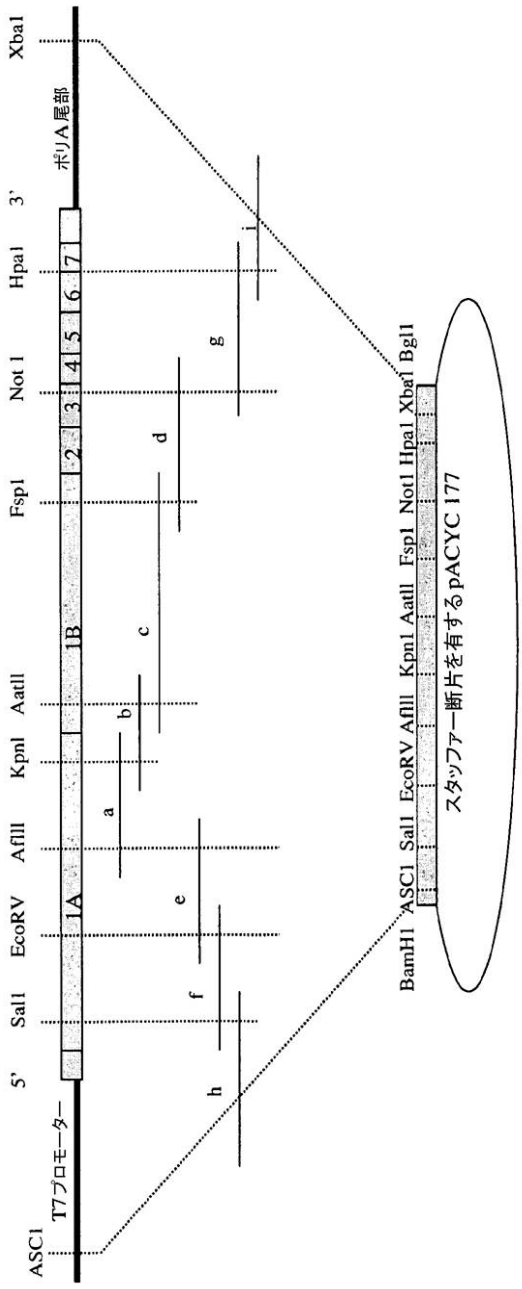
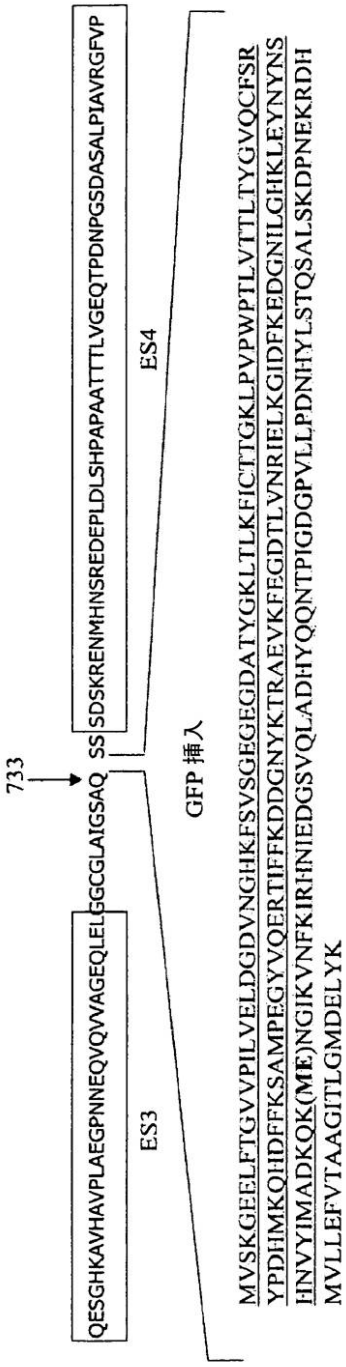


FIG. 15C. ES4 エピトープに基づく ELISA.

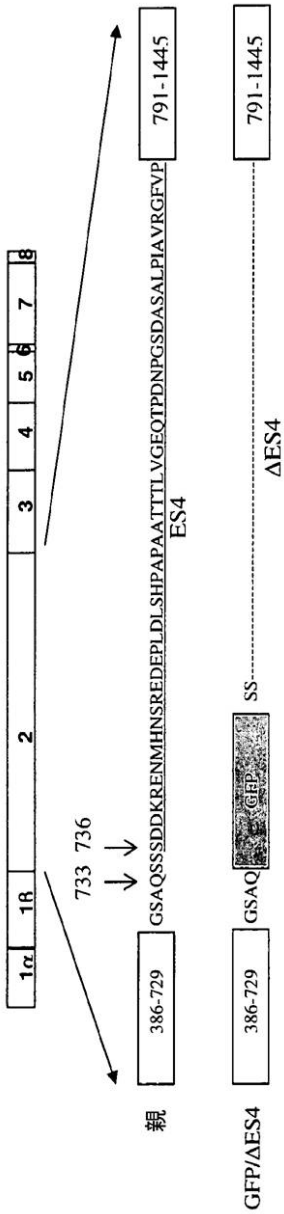
【図１】


ASC1
T7プロモーター
5'
Sal1
EcoRV
AflII
KpnI
AatII
Fsp1
Not 1
Hpa1
3'
ポリA尾部
Xba1
1A
1B
2
3
4
5
6
7
a
b
c
d
e
f
g
h
i
BamH1 ASC1 Sal1 EcoRV AflII Kpn1 AatII Fsp1 Not1 Hpa1 Xba1 Bgl1
スタッファー断片を有するpACYC 177

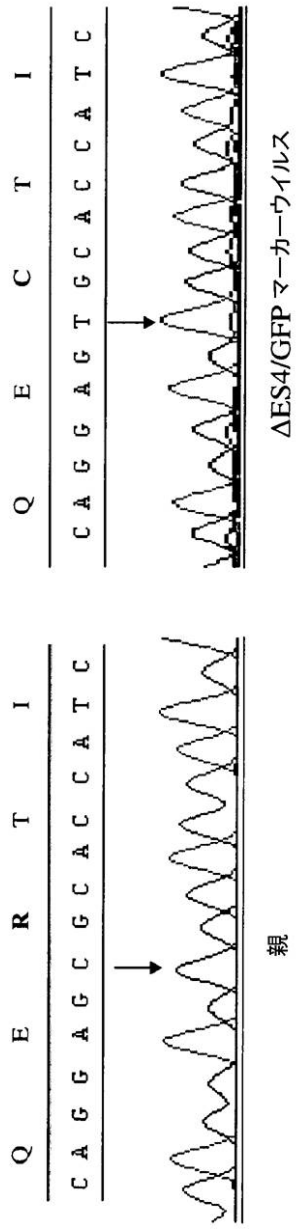
【図７】


733
SS
SDSKRENMHNSREDEPLDLSHPAPAATTTLVGEQTPDNPGSDASALPIAVRGFVP
ES4
GFP 挿入
QESGHKAVHAVPLAEGPNNEQVQVVAGEQLELGGCGLAIGSAQ
ES3
MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSR
YPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNS
HNVYIMADKQK(ME)NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDH
MVLLEFVTAAGITLGMDELYK

【図８】


1α
1β
2
3
4
5
6
7
8
733 736
GSAQSSSDDKRENMHNSREDEPLDLSHPAPAATTTLVGEQTPDNPGSDASALPIAVRGFVP
ES4
791-1445
386-729
親
GSAQ
GFP
SS
ΔES4
791-1445
386-729
GFP/ΔES4

【図１２】



【配列表】
2010531143000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/068041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N7/04 G01N33/569
ADD. C07K14/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N G01N. C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FANG Y ET AL: "Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States" VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 100, no. 2, 15 March 2004 (2004-03-15), pages 229-235, XP002416342 ISSN: 0168-1702 cited in the application the whole document	1-4,10, 11,18
Y		1-20

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 October 2008	19/11/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Galli, Ivo

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/068041

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FANG YING ET AL: "A FULL-LENGTH CDNA INFECTIOUS CLONE OF NORTH AMERICAN TYPE 1 PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS: EXPRESSION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN IN THE NSP2 REGION" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 80, no. 23, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 11447-11455, XP009077448 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document	1,6,8, 10,13
Y		1-20
X	GREBENNIKOVA T V ET AL: "Genomic characterization of virulent, attenuated, and revertant passages of a North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS,ORLANDO, US, vol. 321, no. 2, 10 April 2004 (2004-04-10), pages 383-390, XP004499218 ISSN: 0042-6822 the whole document	1-3,10, 11
A	OLEKSIEWICZ M B ET AL: "Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: The nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 7, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 3277-3290, XP002468630 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/068041

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008 /068041

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5, 9-12,15-18, 20

1.1) A recombinant North American Type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), comprising one or more mutations in open reading frame ORF1, wherein said mutations are such that the recombinant PRRSV fails to produce at least one functional polypeptide corresponding to ORF1a, characterised in that the mutation comprises a deletion. Related kits and methods of differentiating vaccinated from infected animals.

1.2) -- wherein the deletion is limited to the nsp2 region.

1.3) -- wherein the deletion includes epitope ES4, particularly amino acids 736-790.

1.4) -- claim 9 : a combination of subjects 1.3 and 2.2 below.

---

2. claims: 2, 6-9, 10, 13-15, 18-19.

2.1) A recombinant North American Type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), comprising one or more mutations in open reading frame ORF1, wherein said mutations are such that the recombinant PRRSV fails to produce at least one functional polypeptide corresponding to ORF1a, characterised in that the mutation comprises the insertion of a heterologous DNA sequence. Related kits and methods of differentiating vaccinated from infected animals.

2.2) -- wherein the insertion is between amino acid 733 and 734, and particularly the inserted DNA encodes GFP.

2.3) claim 9; a combination of 2.2 and 1.3 above.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N 33/53	N	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ファング，イン
アメリカ合衆国 サウスダコタ州 ５７００６，ブルッキングス，１７番アベニューサウス １９００
(72)発明者 ヘンニングス，ジェーン
アメリカ合衆国 サウスダコタ州 ５７２１２，アーリントン，４５９番アベニュー ２０１７０
(72)発明者 ネルソン，エリック エイ.
アメリカ合衆国 サウスダコタ州 ５７０７１，ヴォルガ，４６３番アベニュー ２１７４８

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 EA04 FA10 GA11
HA01 HA11
4B065 AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 BA14 BA25 CA24 CA45
4C085 AA03 BA51 CC08 DD62 GG01

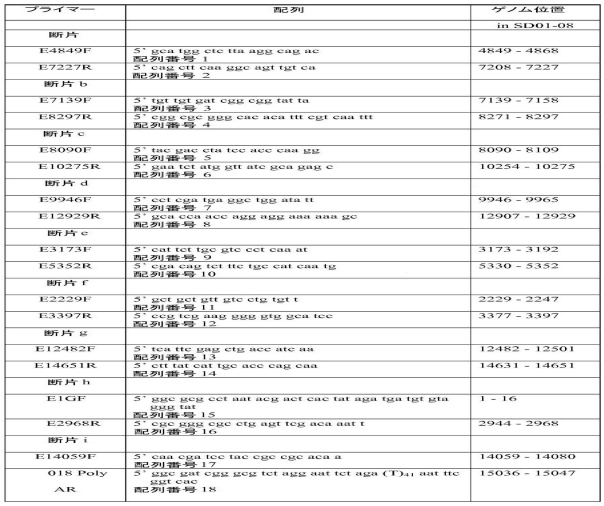
专利名称(译)	重组北美1型猪繁殖呼吸综合症病毒和使用方法

公开(公告)号	JP2010531143A	公开(公告)日	2010-09-24
申请号	JP2010513497	申请日	2008-06-24

[标]申请(专利权)人(译)	南达科他州立大学
申请(专利权)人(译)	南达科他州立大学
[标]发明人	ファングイン ヘンニングスジェーン ネルソンエリックエイ
发明人	ファング,イン ヘンニングス,ジェーン ネルソン,エリック エイ.
IPC分类号	C12N7/06 C12N15/09 A61K39/12 A61P11/00 A61P15/06 G01N33/53
CPC分类号	A61K2039/5254 A61K2039/5256 A61P11/00 A61P15/06 C07K14/005 C12N7/00 C12N15/86 C12N2770/10021 C12N2770/10022 C12N2770/10034 C12N2770/10043 C12N2770/10061
FI分类号	C12N7/06.ZNA C12N15/00.A A61K39/12 A61P11/00 A61P15/06 G01N33/53.N
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA14 4B065/BA25 4B065/CA24 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/BA51 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/GG01
代理人(译)	Goichi高桥
优先权	60/946080 2007-06-25 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

猪繁殖与呼吸综合症病毒（PRRSV）是全球猪肉行业的主要问题。 疫苗中包含标记物将有助于从自然感染野生型病毒的动物中区分出接种过的动物。 使用北美1型PRRSV的cDNA感染性克隆，已制备了标记有PRRSV的重组绿色荧光蛋白（GFP），在nsp2区中包含免疫原性表位ES4的缺失。 基于GFP和ES4表位的ELISA补充了标记物的鉴定。



プライマー	配列	ゲノム位置
		in SD01-08
断片		
E4849F	5' gca tgg ctc tta agg cag ac 配列番号 1	4849 - 4868
E7227R	5' cag ctt caa ggc agt tgt ca 配列番号 2	7208 - 7227
断片 b		
E7139F	5' tgt tgt gat cgg cgg tat ta 配列番号 3	7139 - 7158
E8297R	5' cgg cgc ggg cac aca ttt cgt caa ttt 配列番号 4	8271 - 8297
断片 c		
E8090F	5' tac gac ctt tcc acc caa gg 配列番号 5	8090 - 8109
E10275R	5' gaa tct atg gtt atc gca gag c 配列番号 6	10254 - 10275
断片 d		
E9946F	5' cct cga tga ggc tgg ata tt 配列番号 7	9946 - 9965
E12929R	5' gca cca acc agg agg aaa aaa gc 配列番号 8	12907 - 12929
断片 e		
E3173F	5' cat tct tgc gtc cct caa at 配列番号 9	3173 - 3192
E5352R	5' cga cag tct ttc tgc cat caa tg 配列番号 10	5330 - 5352
断片 f		
E2229F	5' gct gct gtt gtc ctg tgt t 配列番号 11	2229 - 2247
E3397R	5' ccg tcg aag ggg gtg gca tcc 配列番号 12	3377 - 3397
断片 g		
E12482F	5' tca ttc gag ctg acc atc aa 配列番号 13	12482 - 12501
E14651R	5' ctt tat cat tgc acc cag caa 配列番号 14	14631 - 14651
断片 h		
EIGF	5' ggc gcg cct aat acg act cac tat aga tga tgt gta ggg tat 配列番号 15	1 - 16
E2968R	5' cgc ggg cgc ctg agt tcg aca aat t 配列番号 16	2944 - 2968
断片 i		
E14059F	5' caa cga tcc tac cgc cgc aca a 配列番号 17	14059 - 14080
018 Poly AR	5' ggc gat cgg gcg tct agg aat tct aga $(T)_{41}$ aat ttc ggt cac 配列番号 18	15036 - 15047